



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2006

**António Jorge Dias
Balteiro**

**Indução de resistência ao metronidazol e albendazol
em *Giardia lamblia***



**António Jorge Dias
Balteiro**

**Indução de resistência ao metronidazol e albendazol
em *Giardia lamblia***

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Agostinho Cruz, Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto e do Professor Doutor Mário Jorge Pereira, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus filhos Gonçalo e Ricardo e à minha esposa Eugénia pelo incansável apoio e pela confiança que depositaram nesta minha nova etapa profissional.

o júri

presidente

Professor Doutor Fernando José Mendes Gonçalves

Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Paula Maria Façanha da Cruz Fresco

Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professor Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz

Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto

Professor Doutor Mário Jorge Verde Pereira

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra do Instituto Politécnico de Coimbra, na pessoa da sua directora Dr.^a Lúcia Simões, pelas facilidades concedidas para a frequência do mestrado e para a realização de trabalho experimental noutras instituições.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto, na pessoa da sua directora Professora Doutora Cristina Prudêncio, por todas as facilidades concedidas para a realização do trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Agostinho Luis da Silva Cruz, pela sua orientação construtiva e inteligente, pela sua disponibilidade e amizade e por me ter sempre encorajado na execução deste projecto.

Ao Professor Doutor Mário Jorge Verde Pereira, pela sua orientação, constante disponibilidade e amizade.

À minha colega de Mestrado Rita Mónica Ferraz Ferreira de Oliveira, pela sua preciosa ajuda, indispensável para a concretização deste trabalho, pelo seu companheirismo e amizade e por toda a força, apoio e motivação que me deu ao longo do tempo.

À minha colega de Mestrado Maria José Gonçalves Alves, pelo seu apoio, estímulo, companheirismo e amizade.

Aos meus Filhos e à minha Esposa por terem sabido compreender as horas que lhes tirei e por me terem sempre apoiado e incentivado.

A todos os que directa ou indirectamente contribuíram para o sucesso deste trabalho o meu eterno agradecimento.

palavras-chave

Giardia lamblia, resistência, metronidazol, albendazol.

resumo

Na giardiose humana, a falência da terapêutica ocorre cada vez com mais frequência devido, em parte, à resistência da *Giardia lamblia* aos fármacos. Assim, a obtenção *in vitro* de um isolado resistente permitirá aprofundar o conhecimento dos mecanismos de resistência desenvolvidos e proporcionar um combate mais eficaz contra esta parasitose. Estudos laboratoriais têm conduzido ao desenvolvimento de metodologias de indução de resistência *in vitro* às drogas de forma a complementar as análises clínicas dos isolados. O presente trabalho teve como principais objectivos, a obtenção de um isolado resistente ao metronidazol e ao albendazol, fármacos anti-giardiose com diferentes locais alvo e mecanismos de acção distintos, bem como padronizar uma metodologia de indução de resistência *in vitro* que seja referencial para trabalhos futuros. Para o processo de indução de resistência foram utilizadas duas metodologias de exposição distintas: a exposição contínua e a exposição intermitente dos trofozoitos aos fármacos em estudo. Para o metronidazol, cujo processo de indução foi mais fácil e rápido de obter, as concentrações finais de exposição foram de 1000µM para a exposição intermitente e de 20µM para a exposição contínua. Em relação ao albendazol, cujo processo de indução foi muito mais complicado e moroso, atingiu-se os valores de 4µM e de 0,25µM para a exposição intermitente e contínua respectivamente. Os resultados para a metodologia intermitente de exposição ao metronidazol, no que respeita à concentração final de exposição, valores da IC₅₀ (53,03µM) e da MLC ([3000µM – 4000µM]), foram claramente superiores à metodologia de exposição contínua (24,71µM e [1000µM – 2000µM], respectivamente), podendo considerar-se a primeira como a metodologia mais eficaz e de mais fácil e rápida execução para a indução de resistência ao metronidazol em *G. lamblia*. Ao invés, os resultados para o albendazol demonstraram, tendo em conta os valores finais da IC₅₀ (0,358µM) e da MLC ([6,25µM – 12,5µM]), que a metodologia mais adequada para induzir resistência *in vitro* ao albendazol em *Giardia lamblia* é a exposição contínua.

keywords

Giardia lamblia, resistance, metronidazole, albendazole.

abstract

Therapeutic failure in human giardiasis is becoming more frequent due to drug resistance. Therefore, obtaining a resistant isolate, *in vitro*, will allow treating these parasitoses more efficiently. Laboratorial studies have conducted to the development of induction drug resistance methodologies *in vitro*, so that isolates clinical analyses are complemented. The objectives of this work were to obtain a metronidazole-resistant and albendazole-resistant isolates, anti-giardial agents with different targets and distinct mechanisms of action, and standardize an induction drug resistance methodology *in vitro*, to be a reference to future studies. Two exposure methodologies were used for the resistance induction process: trophozoites continued exposure and trophozoites intermittent exposure to the drugs. Metronidazole induction process was easier and fastest, with final exposure concentration of 1000µM for intermittent exposure and 20µM for continued exposure. Induction of albendazole resistance process was more difficult, needed more time, and final concentrations were 4µM and 0.25µM for intermittent and continued exposures, respectively. Metronidazole intermittent exposure methodology results, specially concerning final concentration of exposure, IC₅₀ (53,03µM) and MLC ([3000µM-4000µM]) values were better from those obtained with continued exposure methodology (24,71µM and [1000µM-2000µM], respectively). We can consider the first methodology more effective, easier and of rapid execution to metronidazole resistance induction in *Giardia lamblia*. On the contrary, albendazole results, IC₅₀ (0,358µM) and MLC ([6,25µM-12,5µM]), had demonstrated that continued exposure is the best methodology to induce *Giardia Lambia* albendazole resistance *in vitro*.

ÍNDICE

Capítulo I

Introdução geral	10
1. Enquadramento do tema	10
2. Objectivos	13
3. Estrutura da dissertação	16
4. Referências bibliográficas	16

Capítulo II

Indução de resistência em <i>Giardia lamblia</i> a review	21
------------------------------------------------------------------	-----------

Capítulo III

Indução de resistência ao metronidazol e albendazol em <i>Giardia lamblia</i>	74
--------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Capítulo IV

Discussão geral	101
Referências bibliográficas	105

Anexos

Anexo I	125
Anexo II	126

Capítulo I

Introdução Geral

Introdução Geral

1. Enquadramento do tema

Giardia lamblia, também conhecida como *G. intestinalis* ou *G. duodenalis* é o parasita protozoário flagelado mais comum no tracto intestinal dos Humanos (Marshall *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2003). É o organismo causal da giardiose (Sangster *et al.*, 2002), infecção cuja presença pode ser assintomática ou, através de infecções intensas, ser responsável por um quadro clínico que pode englobar perturbações gastrointestinais como diarreias, má absorção, dores abdominais e por distúrbios no crescimento, particularmente na criança (Adam, 1991; Cruz *et al.*, 2003b). Esta doença é particularmente prevalente nos países em desenvolvimento, onde as infecções estão relacionadas com as fracas condições de higiene, pobre controlo de qualidade da água e elevada densidade populacional (Mineno & Avery, 2003).

A giardiose é considerada uma importante doença parasitária em Portugal, mas existe falta de informação relativamente ao perfil de susceptibilidade antimicrobiano das estirpes que parasitam a população portuguesa (Cruz *et al.*, 2003a).

O estabelecimento de culturas axénicas de *Giardia lamblia* em Portugal tornou possível avaliar a susceptibilidade dos isolados aos fármacos antiparasitários.

Existem vários fármacos aprovados e utilizados para o tratamento da giardiose. A estratégia terapêutica tem incluído diversos fármacos de uso tradicional tais como o metronidazol, a quinacrina, a furazolidona e a paromomicina (Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004). Outros fármacos de introdução mais recente como o albendazol e a nitazoxamida têm sido aplicados na prática clínica (Rodríguez-García, 1999; Abboud *et al.*, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004). O metronidazol, pertencente ao grupo dos 5-nitroimidazóis, e o albendazol, pertencente ao grupo dos

benzimidazóis, podem ser considerados como os mais representativos agentes anti-giardiose de uso tradicional e de uso recente, respectivamente (Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

Contudo, existem evidências de um aumento da frequência de casos refractários ao tratamento com estas drogas (Mendelson, 1980; Gordts *et al.*, 1985; Boreham *et al.*, 1988a; Kollaritsch *et al.*, 1993; Brasseur & Favennec, 1995; Arguello-Garcia *et al.*, 2004), as causas para tal incluem tratamentos inadequados e a emergência de casos de resistência (Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

A falência do tratamento anti-giardiose tem sido atribuído à resistência aos nitroimidazóis (Lemée *et al.*, 2000; Abboud *et al.*, 2001), contudo esta tem sido relatada para todos os agentes anti-giardiose, incluindo não só o metronidazol, como a quinacrina, a furazolidona e o albendazol (Upcroft & Upcroft, 2001). Na giardiose humana, a falência da terapêutica ocorre cada vez com maior frequência devido não só à reinfestação como à resistência do parasita aos fármacos (Lemée *et al.*, 2000).

Estudos laboratoriais têm desenvolvido metodologias de indução de resistência *in vitro* às drogas de forma a complementar as análises clínicas dos isolados de *Giardia duodenalis* (Upcroft, 1998, Upcroft & Upcroft, 2001). A indução de resistência *in vitro* justifica-se pela dificuldade de obtenção de isolados resistentes e pela enorme importância que estes encerram para o estudo dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos parasitas.

O desenvolvimento da indução de resistência através de vários regimes de fármacos incluindo aumento da concentração a níveis sub-letais ou a exposições curtas e múltiplas a níveis letais, para as células dos isolados sensíveis, administrados com ou sem mutagénese, têm fornecido consideráveis informações acerca da capacidade dos parasitas para fortalecer a sua resistência e protecção, bem como dos mecanismos envolvidos (Cerkasovova *et al.*, 1988a; Cerkasovova *et al.*, 1988b; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1994b; Upcroft, 1994; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b; Brown *et al.*, 1998; Upcroft, 1998; Brown *et al.*, 1999; Kulda, 1999; Upcroft *et al.*, 1999; Upcroft & Upcroft, 1999; Upcroft & Upcroft, 2001).

Na bibliografia encontram-se muito poucas referências sobre indução de resistência em *G. lamblia in vitro*, contudo, a resistência *in vitro* foi induzida para quatro grandes grupos de fármacos: nitroimidazóis (metronidazol) (Boreham *et al.*, 1988b; Townson *et al.*, 1992), nitrofuranos (furazolidona) (Townson *et al.*, 1992), acridinas (quinacrina) (Upcroft *et al.*, 1996a) e benzimidazóis (albendazol) (Upcroft *et al.*, 1996b; Lindquist, 1996).

Townson *et al.* (1992), nos seus trabalhos sobre indução de resistência ao metronidazol e à furazolidona, classificou as metodologias de indução de resistência utilizadas em três tipos: metodologia de exposição contínua ou constante, metodologia de exposição intermitente e metodologia com mutagénese por exposição à luz ultravioleta (UV).

Embora, na nossa opinião, se possa estender a classificação anteriormente referida a todos os trabalhos de indução de resistência *in vitro* em *Giardia lamblia*, existem diferenças significativas nas condições de aplicação das metodologias que dificultam a sua classificação bem como a sua efectiva comparação e o estabelecimento de um procedimento padrão dentro de cada metodologia. Podemos encontrar dois tipos de obstáculos, por um lado variáveis tais como o isolado de *Giardia lamblia*, o princípio activo utilizado, a concentração inicial e as concentrações subsequentes utilizadas, o tempo de exposição aos fármacos, entre outras, que diferem de estudo para estudo e, por outro lado, a ausência de parâmetros que definam o nível de perda de sensibilidade e/ou de aumento de resistência como sejam a concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀) e a concentração mínima letal (MLC). Segundo Arguello-García *et al.* (2004), a MLC é o parâmetro mais adequado para avaliar a susceptibilidade/resistência e também o mais conveniente para comparar diferentes metodologias de avaliação da sensibilidade, e a IC₅₀ o parâmetro mais adequado para caracterizar a variação na susceptibilidade dos parasitas aos fármacos.

Existe pois uma necessidade real de padronizar e normalizar uma metodologia de indução de resistência *in vitro* para a *Giardia lamblia* que permita, de forma efectiva, comparar os resultados obtidos e estudar os mecanismos de resistência envolvidos.

2. Objectivos

A finalidade de este estudo é obter, pela primeira vez em Portugal, um isolado resistente passível, no futuro, de ser objecto de múltiplas investigações tendo em vista aumentar os conhecimentos sobre a giardiose e os mecanismos de resistência aos antiparasitários desenvolvidos.

Assim entendeu-se estabelecer como prioritários os seguintes objectivos:

1. Conseguir *in vitro*, a partir de trofozoítos previamente isolados e axenizados por Cruz *et al.* (2003), isolados resistentes ao metronidazol e isolados resistentes ao albendazol.
2. Estabelecer uma metodologia padrão para a indução *in vitro* de resistência a antiparasitários em *Giardia lamblia*, que combine a eficácia com a rapidez e a simplicidade, para a obtenção de isolados resistentes.
3. Obter uma colecção abundante de trofozoítos em diferentes estadios do processo de indução de resistência, para que esta se possa analisar, em trabalhos futuros, ao nível celular, molecular, bioquímico, genético, entre outros.

Justificação dos objectivos e importância dos resultados no estado actual dos conhecimentos

Para o estado actual dos conhecimentos apresentam-se três itens que justificam os objectivos traçados para o presente estudo:

1. A giardiose é considerada uma importante doença parasitária não só em Portugal como também em todo o mundo, contudo existe falta de informação relativamente ao perfil de susceptibilidade/resistência aos antiparasitários das

estirpes que parasitam a população portuguesa, bem como aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelo parasita. A constatação de resistências, quer ao metronidazol quer ao albendazol, já observadas noutros países (Farbey *et al.*, 1995; Lemée *et al.*, 2000), ainda não se encontra descrita para Portugal. Assim, a obtenção *in vitro* de um isolado resistente permitirá aprofundar o conhecimento dos mecanismos de resistência desenvolvidos de forma a possibilitar um combate mais eficaz contra esta parasitose. O estabelecimento de culturas axénicas de *Giardia lamblia* em Portugal tornou possível avaliar a susceptibilidade dos isolados aos fármacos antiparasitários. Deste modo, induzindo resistência a um isolado axenizado por Cruz *et al.* em 2003, é possível cumprir o primeiro objectivo e contribuir futuramente para o aumento do conhecimento sobre a resistência da *G. lamblia* ao metronidazol e ao albendazol, dois fármacos anti-giardiose com mecanismos de acção e sítios alvo distintos. Assim, o isolado resistente ao metronidazol e o isolado resistente ao albendazol poderá permitir compreender, em ambos os fármacos, os mecanismos de resistência, que se esperam distintos em face dos seus diferentes modos de actuação. O isolado resistente poderá também ser bastante útil para uma utilização mais racional destes fármacos e, em caso de comprovada resistência clínica, possibilitar uma terapêutica com moléculas mais eficazes, com recorrência a fármacos de segunda linha com actuação em diferentes sítios alvo de forma a se poder ultrapassar as dificuldades terapêuticas originadas pela resistência, assim como poderá servir de inspiração para as estratégias de design de novas drogas.

2. Existem evidências de um aumento da frequência de casos refractários ao tratamento com estas drogas (Mendelson, 1980; Gordts *et al.*, 1985; Boreham *et al.*, 1988a; Kollaritsch *et al.*, 1993; Brasseur & Favennec, 1995; Arguello-Garcia *et al.*, 2004), as causas para isto incluem tratamentos inadequados e a emergência de casos de resistência (Arguello-Garcia *et al.*, 2004). Estudos laboratoriais têm desenvolvido metodologias de indução de resistência *in vitro* às drogas de forma a complementar as análises clínicas dos isolados de *Giardia duodenalis* (Upcroft, 1998, Upcroft & Upcroft, 2001). Contudo, a

deficiente e exígua informação encontrada em alguns artigos sobre a metodologia usada para a indução de resistência e sobre os resultados obtidos, aliada à diversidade de metodologias utilizadas bem como às diferenças significativas entre estas, no que diz respeito por exemplo ao tempo e às concentrações iniciais e subsequentes de exposição, dificultam, sobremaneira, não só a compreensão e o estabelecimento de normativas para a indução de resistência *in vitro* mas também a comparação efectiva dos resultados obtidos e das metodologias usadas. Assim, o cumprimento do segundo objectivo permitirá contribuir para definir uma metodologia que seja referencial para futuros trabalhos de indução de resistência *in vitro* em *Giardia lamblia*, tendo em conta os factores eficácia e rapidez considerados como essenciais para a obtenção de isolados resistentes.

3. Internacionalmente existem colecções de isolados axénicos de *G. lamblia* que permitem traçar *in vitro* o perfil de susceptibilidade/resistência a antiparasitários, entre os quais Portugal. Todavia, no que respeita à obtenção de isolados resistentes, a princípios activos com diferentes mecanismos de acção, as colecções são praticamente inexistentes, o que levanta inúmeras dificuldades à realização de estudos. Assim, a obtenção de uma colecção de trofozoítos em diferentes estadios do processo de indução de resistência poderá permitir no futuro a avaliação sequencial da sua adaptação / resistência aos fármacos, bem como verificar se esta é resultante de uma diferenciação genética ou de uma adaptação morfofuncional. Deste modo, o cumprimento do terceiro objectivo permitirá tirar ilações importantes acerca da capacidade por parte do parasita de desenvolver mecanismos progressivos de adaptação em condições adversas do meio e avaliar a evolução destes mecanismos ao longo do tempo. A detecção de novos mecanismos de resistência do parasita aos fármacos poderá trazer um acréscimo considerável de informação e de novos conhecimentos que deverão ser relacionados com os mecanismos já conhecidos. Sendo, segundo Arguello-García *et al.* (2004), a MLC o parâmetro mais seguro para definir a susceptibilidade e a resistência e também o mais conveniente para comparar diferentes tipos de ensaios de sensibilidade, e a

IC₅₀ o parâmetro mais adequado para caracterizar a variação na susceptibilidade dos parasitas às drogas, far-se-á a determinação dos valores da MLC e da IC₅₀, através de ensaios de susceptibilidade por inibição da capacidade de aderência dos trofozoítos às paredes do tubo de cultura de Meloni *et al.* (1990), de forma a melhor se avaliar o grau de resistência desenvolvido.

3. Estrutura da Dissertação

Esta dissertação é constituída por três capítulos, possuindo ainda uma discussão geral e o conjunto de referências bibliográficas utilizadas na sua realização e citadas nesses capítulos. O primeiro capítulo diz respeito a esta introdução correspondendo os restantes dois a uma revisão bibliográfica e o seguinte à prossecução dos objectivos supra enumerados. Estes estão apresentados na forma de artigos científicos e apresentam a estrutura sob a qual foram ou virão a ser submetidos para publicação em revistas científicas da especialidade.

4. Referências Bibliográficas

Abboud, P., V. Lemée, G. Gargala, P. Brasseur, J. J. Ballet, F. Borsa-Lebas, F. Caron & L. Favennec. 2001. Sucessful treatment of Metronidazol- and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.

Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.

Arguello-García, R., M. Cruz-Soto, L. Romero-Montoya & G. Ortega-Pierres. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.

Boreham, P. F. L., N. C. Smith & R. W. Shepherd. 1988a. Drug resistance and the treatment of giardiasis. *In Advances in Giardia Research.* 3-7.

Boreham, P. F. L., R. E. Philips & R. W. Shepherd. 1988b. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**:104-106.

Brasseur, P. & L. Favenec. 1995. Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. *Parasite.* **2**:422-424.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, H. N. Dodd, N. Chen & P. Upcroft. 1999. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **98**:203-214.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, M. R. Edwards & P. Upcroft. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**:155-161.

Brown, D. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. A H₂O-producing NADH oxidase from protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **28**:149-164.

Cerkasovová, A., J. Cerkasov & J. Kulda. 1988a. Resistance of trichomonads to metronidazole. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:485-503.

Cerkasovová, A., J. Novák, J. Cerkasov, J. Kulda & J. Tachezy. 1988b. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:505-512.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, E. Leite, J. C. F. Sousa & M. Cabral. 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, M. C. Silva, J. C. F. Sousa, O. Manso & M. Cabral. 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs in vitro. *Acta Tróp.* **88**:131-135.

Farbey, M., J. Reynoldson & R. Thompson. 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int. J. Parasitol.* **25**:593-599.

Gardner, T. B. & D. R. Hill. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.

Gordts, B., W. Hemelhof, C. Asselman & J. P. Butzler. 1985. *In vitro* susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:378-380.

Harris, J. C., S. Plummer & D. Lloyd. 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.

Kollaritsch, H., E. Jeschko & G. Wiedermann. 1993. Albendazole is highly effective against cutaneous larva migrans but not against *Giardia* infection: results of an open pilot trial in travellers returning from the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**:689.

Kulda, J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* **29**:199-212.

Lemée, V., I. Zaharia, G. Nevez, M. Rabodonirina, P. Brasseur, J. J. Ballet & L. Favennec. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:819-821.

Marshall, M., D. Naumovitz, C. Ortega R Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:67-85.

Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

Mendelson, R. M. 1980. The treatment of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**:438-439.

Mineno, T. & M. A. Avery. 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.

Rodríguez-García, R., L. M. Rodríguez-Guzmán & A. H. Cruz del Castillo. 1999. Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of *Giardia lamblia* in children. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **64**:122-126.

Sanchez, L. B. 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanisms of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**:57-64.

Sangster, N., P. Batterham, H. D. Chapman, M. Duraisingh, L. Le Jambre, M. Shirley, J. Upcroft & P. Upcroft. 2002. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int. J. Parasitol.* **32**:637–653.

Townson, S. M., G. R. Hanson, J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1994a. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **220**:439-446.

Townson, S. M., H. Laqua, P. Upcroft, P. Boreham & J. Upcroft. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.

Townson, S. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. Characterization and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**:183-193.

Townson, S. M., P. F. L. Boreham, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 1994b. Resistance to nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop.* **56**:173-194.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1999. Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:447-449.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell & P. Upcroft. 1996a. Quinacrine - resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology.* **112**:309-313.

Upcroft, J., R. Mitchell, N. Chen & P. Upcroft. 1996b. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin. *Microbial Drug resistance.* **2(3)**:303-308.

Upcroft, P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistance Updates.* **1**:166-168.

Upcroft, P. 1994. Multiple drug resistance in the pathogenic protozoa. *Acta Tróp.* **56**:195-212.

Wright, J. M., L. A. Dunn, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2(6)**:529-5541.

Capítulo II

Indução de Resistência em *Giardia lamblia* a Review

Indução de Resistência em *Giardia lamblia* a Review

Jorge Balteiro^{1,4,5}; Rita F. Oliveira^{2,4}; Maria José Alves^{3,4}; Mário J. Pereira⁴; Agostinho Cruz².

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-997 Coimbra, Portugal

²Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 4000-294 Porto, Portugal

³Hospital Distrital de Chaves, Laboratório de Patologia Clínica, 5400-279 Chaves, Portugal

⁴Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁵Corresponding author: balteiro@estescoimbra.pt; Phone. + 351 239 802 430; fax. +351 239 813 395

Paper in draft form

Indução de Resistência em *Giardia lamblia* a Review

Resumo:

Na giardiose humana, uma importante doença infecciosa em todo o mundo, a falência da terapêutica ocorre cada vez com maior frequência devido, em parte, à resistência do parasita aos fármacos. Estudos laboratoriais têm desenvolvido metodologias de indução de resistência *in vitro* às drogas de forma a complementar as análises clínicas dos isolados de *Giardia lamblia*. A resistência *in vitro* tem sido demonstrada para quatro tipos de fármacos: metronidazol, o tratamento standard nesta parasitose, quinacrina, furazolidona e albendazol. O objectivo principal deste estudo de revisão bibliográfica é elaborar uma compilação de todos os trabalhos de indução de resistência *in vitro* em *G. lamblia* publicados até à presente data, descrevendo, entre outras, os resultados obtidos, as metodologias e as concentrações iniciais e finais utilizadas. Tentando estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos e as metodologias utilizadas em todos os trabalhos de indução de resistência é adoptado por nós a classificação de Townson *et al.* (1992): metodologia de exposição contínua ou constante, de exposição intermitente e de exposição aos raios UV para todos eles. A deficiente e exígua informação encontrada em alguns artigos, nomeadamente no que respeita às condições de aplicação das metodologias usadas, bem como as diferenças significativas entre estas, dificultaram sobremaneira a compreensão e a comparação efectiva dos resultados obtidos e das metodologias usadas. Também a ausência de qualquer informação acerca da variação dos valores da IC₅₀ e da MLC ao longo dos processos de indução de resistência, considerados parâmetros seguros para definir a susceptibilidade e a resistência dos parasitas às drogas, não permite avaliar e comparar com exactidão o grau de resistência final dos isolados em estudo.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, antiparasitários, giardiose, resistência.

Abstract:

Giardiasis is an important worldwide disease. Therapeutic failure occurs more frequently due to drug-resistance of the parasite. Laboratorial studies have been developing *in vitro* drug-resistance induction methodologies, so that *Giardia lamblia* clinical analyses are complemented. *In vitro* resistance has been tested for four drugs: metronidazole, giardiasis standard treatment, quinacrine, furazolidone and albendazole. This review intends to compile all published articles about *in vitro* resistance induction in *Giardia lamblia* until today, mentioning, among other things, methodologies and initial and final concentrations used. Trying to compare results obtained and methodologies used, Townson *et al.* (1992) classification, adapted, was used: continued or constant exposure methodology, intermittent exposure methodology and UV exposure. Deficient and exiguous information found in some articles, especially concerning methodology application conditions, as well as significant differences between them, caused difficulties in the comprehension and effective comparison of results and methodologies used. Furthermore, the absence on information related to IC₅₀ and MLC variation during resistance induction process, considered secure parameters to define drug susceptibility and resistance, does not permit final resistance evaluation and comparison of studied isolates.

Keywords: *Giardia lamblia*, anti-giardial agents, giardiasis, resistance.

1. Introdução

Giardia é um protozoário flagelado observado pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek em 1681 e mais pormenorizadamente descrito por Lamb em 1859 (Ortega & Adam, 1997).

De biologia simples este parasita apresenta um ciclo de vida monoxeno em que a fase de trofozoíto, presente no intestino do hospedeiro, alterna com a fase

de quisto, estrutura de resistência emitida conjuntamente com as fezes para o exterior, sendo esta a forma responsável pela propagação da parasitose (Jones, 1991; Flanagan, 1992).

Giardia lamblia, também denominado por *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*, é o parasita patogénico mais frequente no intestino do homem nos países desenvolvidos (Thompson *et al.*, 1994).

Espécies de *Giardia* morfologicamente idênticas foram encontradas a infectar os humanos e para cima de quarenta outros mamíferos incluindo gatos, cães, porcos, ovelhas, cavalos, vacas, etc. As infecções com *Giardia* podem ocorrer por transmissão zoonótica (Thompson, 2000).

A giardiose é considerada uma doença altamente contagiosa, as infecções podem resultar da ingestão de dez ou menos quistos de *Giardia* (Rendtorff, 1954; Wright *et al.*, 2003). Os quistos de *G. lamblia* são imediatamente infecciosos para o Homem quando passam para as fezes.

A transmissão directa pessoa a pessoa é causada frequentemente pelo contacto interpessoal (Wilson, 1998) e pode causar surtos epidémicos em infantários ou outras instituições, assim como espalhar a infecção entre os membros da família. Normalmente, quando um membro da família contrai a doença os outros também ficam infectados. O parasita também pode ser transferido através do contacto fecal – oral ou pela ingestão de água contaminada pelas fezes, particularmente quando as práticas higiénicas são medíocres (Mineno & Avery, 2003). Embora menos comum, a transmissão pode ocorrer via alimentos contaminados através do seu manuseamento (Ortega & Adam, 1997). O contacto homossexual masculino é outra via de transmissão da giardiose (Hill, 1993; Ortega & Adam, 1997).

Esta doença é particularmente prevalente nos países em desenvolvimento, onde as infecções estão relacionadas com as fracas condições de higiene, pobre controlo de qualidade da água e elevada densidade populacional (Mineno & Avery, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que duzentos e oitenta milhões de pessoas são infectadas todos os anos com *Giardia duodenalis* (Wright *et al.*, 2003).

A sua prevalência a nível mundial varia entre 2 e 5% (Kappus *et al.*, 1994), situando-se entre 20 e 30% em países em desenvolvimento (Ortega & Adam, 1997). Nas crianças a prevalência é superior, variando de frequências até 5% em países como a Nigéria (Enekwechi & Azubike, 1994), a Espanha (Armengol *et al.*, 1997) e o Camboja (Lee *et al.*, 2002), até valores da ordem dos 34% em crianças do Chile (Navarrete & Torres, 1994) e mesmo de 62% na Palestina (Yassin *et al.*, 1999).

Em Portugal, os estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos são escassos, variando a frequência da giardiose entre 9 e 28% em crianças e jovens até aos 16 anos. Em áreas onde existem más condições sanitárias ou em estações de tratamento de água com funcionamento deficiente a frequência desta parasitose é mais elevada, sendo as crianças as principais afectadas (Poiars da Silva, 1992).

Um estudo recente na população portuguesa de Cruz *et al.* (2002), com 471 crianças de idades compreendidas entre os 5 e os 13 anos, revelou ser a giardiose a parasitose mais repetida com uma frequência de 10,2%.

Nos países em desenvolvimento a giardiose é uma importante causa de morbilidade, particularmente em crianças, e é a causa mais comum de diarreia crónica em viajantes (Farthing, 1996).

O período de incubação, após a ingestão dos quistos é de 1-2 semanas acompanhado de vários tipos de sintomas (Wright *et al.*, 2003). O estado agudo dura 3-4 dias, mas pode persistir por mais tempo (Upcroft & Upcroft, 2001).

Embora a sua presença possa ser assintomática, infecções intensas por *G. lamblia* são responsáveis por um quadro clínico que pode englobar perturbações gastrointestinais, diarreias, má absorção, dores abdominais e por distúrbios no crescimento particularmente na criança (Adam, 1991; Cruz *et al.*, 2003b).

O estado imunitário do hospedeiro influencia a susceptibilidade do hospedeiro à infecção (Olson, 2000). Infecções e diarreia persistentes podem ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, com deficiência na Imunoglobulina A (IgA) ou com imunodeficiências várias, mas é, menos obvio, em casos de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Adam, 1991; Hill, 1995; Farthing, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Wright *et al.*, 2003).

Para o tratamento da giardiose, os doentes com SIDA podem necessitar de terapêutica combinada e prolongada (Mineno & Avery, 2003).

2. Tratamento da Giardiose

Existem algumas alternativas terapêuticas para tratar os doentes sintomáticos na tentativa não só de aliviar os sintomas e prevenir o desenvolvimento de doença crónica, mas, principalmente, com a intenção de eliminar a parasitose (Quadro 1).

Os portadores assintomáticos em áreas não endémicas devem ser tratados sempre que identificados, uma vez que podem transmitir a infecção ou desenvolver doença sintomática, não sendo todavia um tratamento muito fácil dado que, dependendo do país, nem sempre todos os fármacos estão disponíveis e nenhum é eficaz em todos os casos, para além de ocorrerem, para muitos deles, efeitos adversos ou contra-indicações de maior ou menor gravidade (Davidson, 1984; Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001).

Existem vários fármacos aprovados e utilizados para o tratamento da giardiose. A estratégia terapêutica tem incluído diversos fármacos de uso tradicional tais como o metronidazol, a quinacrina, a furazolidona e a paromomicina (Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004). Outros fármacos de introdução mais recente como o albendazol e a nitazoxamida têm sido aplicados na prática clínica (Rodríguez-García, 1999; Abboud *et al.*, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004). Destes, o metronidazol, pertencente ao grupo dos 5-nitroimidazóis, e o albendazol, pertencente ao grupo dos benzimidazóis, podem ser considerados como os mais representativos agentes anti-giardiose de uso tradicional e de uso recente, respectivamente (Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

Contudo, existem evidências de um aumento da frequência de casos refractários ao tratamento com estas drogas (Mendelson, 1980; Gordts *et al.*, 1985; Boreham *et al.*, 1988; Kollaritsch *et al.*, 1993; Brasseur & Favennec, 1995; Arguello-Garcia *et al.*, 2004), as causas para isto incluem tratamentos

inadequados e a emergência de casos de resistência (Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

Apesar dos diversos casos de patologia declarada de giardiose, inúmeros deles exigindo mesmo hospitalização (Lengerich *et al.*, 1994), e das milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, poucos têm sido os trabalhos de revisão sobre a terapêutica efectuados para esta parasitose. A inexistência de protocolos clinicamente estabelecidos e publicados para o seu tratamento, conduziu Gardner & Hill (2001) a realizarem uma compilação, na tentativa de condensar informação importante sobre o tema, tanto mais que começa a ser marcante a necessidade de se encontrarem alternativas à terapêutica habitual, dado os casos de resistência que surgem e as poucas alternativas terapêuticas de que dispomos (McIntyre *et al.*, 1986; Meloni *et al.*, 1990; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

No Quadro 1 encontram-se descritos alguns princípios activos utilizados no tratamento da giardiose, bem como a posologia recomendada para adultos e crianças.

Quadro 1: Doses recomendadas dos principais princípios activos anti-*Giardia*

Fármaco	Dosagem para adultos	Dosagem para pediatria	Referência
Quinacrina	100mg (3 x dia) x 5-7 dias	2mg/kg (3 x dia) x 7 dias	Gardner & Hill, 2001
Furazolidona	100mg (4 x dia) x 7-10 dias	2mg/kg (4 x dia) x 10 dias	
Paromomicina	500mg (3 x dia) x 5-10 dias	30mg/kg/dia em 3 doses x 5-10 dias	
Albendazol	400mg (1 x dia) x 10 dias	15mg/kg/dia x 7 dias (máx. 400mg)	
Metronidazol	250mg (3 x dia) x 5-7 dias	5mg/kg (3 x dia) x 5-7 dias	
Nitazoxanida	500mg (2 x dia) x 3 dias	12-47 Meses: 100mg (2 x dia) x 3 dias 4-11 Anos: 200mg (2 x dia) x 3 dias	Cohen, 2005

2.1. Quinacrina

A quinacrina, também conhecida como mepacrina e atebрина, é um substituto da acridina introduzida nos Estados Unidos da América (EUA) em meados de 1930 para tratar a malária (Upcroft *et al.*, 1996). Para o tratamento da

giardiose, a quinacrina foi o primeiro antiparasitário eficaz, com uma taxa de cura de 92 a 95% (Wolfe, 1998), até ser suplantado pelo Metronidazol, contudo ainda é utilizada em alguns países como, por exemplo, a França (Boreham, 1994; Upcroft, 1998).

Geralmente, a susceptibilidade *in vivo* e *in vitro* da *Giardia* à quinacrina é comparável com o metronidazol, tendo a primeira como vantagem o facto de também matar os quistos (Gillin & Diamond, 1981).

O mecanismo de acção da quinacrina não é ainda completamente conhecido. A sua actividade antiprotozoária envolve a ligação ao ácido desoxirribonucleico (ADN) da *G. lamblia* (Gardner & Hill, 2001), inibindo, esta interacção, a síntese do ácido nucléico.

Estudos farmacocinéticos em humanos mostraram que a quinacrina exhibe alta ligação e afinidade aos tecidos e plasma depois da sua administração oral, sendo por isso caracterizada por uma longa semi-vida e lenta excreção, o que leva a uma possível exposição continua a este agente.

Os riscos a longo prazo da quinacrina são a sua conhecida mutagenocidade e possível carcinogenicidade em roedores, indicador do risco de desenvolver cancro em humanos.

A Food and Drug Administration (FDA) listou várias consequências associadas com a quinacrina: possível aumento do risco para cancros do tracto reprodutivo, desenvolvimento de lesões uterinas anormais, falhas no comportamento, gravidez ectópica, amenorreia prolongada e exposição fecal. Os efeitos laterais associados à quinacrina incluem tonturas, enxaquecas, vómitos, resposta psicótica e coloração azul ou amarela da pele. Por tudo isto, o tratamento standard da giardiose teve de ser alterado (Mineno & Avery, 2003).

Apesar de não estar disponível numa série de países, devido aos seus efeitos adversos, tem sido provado a eficácia da quinacrina no caso da falência do tratamento (Nash, 2001).

A resistência à quinacrina em laboratório em isolados de *Giardia* surge via exclusão da droga do parasita por um mecanismo ainda não identificado (Upcroft *et al.*, 1996).

2.2. Furazolidona

A furazolidona é um anti-infeccioso derivado do nitrofurano e aprovado pela FDA em 1955 para o tratamento da diarreia e enterite bacteriana ou protozoária. É um dos fármacos menos eficazes mas é a primeira escolha para o tratamento da giardiose nos EUA. A taxa de cura para este agente terapêutico é descrita como 80 a 89% (Mineno & Avery, 2003).

A furazolidona permanece como um agente terapêutico prático, desde que é prescrita como formulação líquida, e tem provado ser muito útil em crianças (Boreham, 1994). Embora não tão eficaz como o metronidazol é, apesar disso, correntemente utilizada em vários países, como por exemplo a Austrália (Upcroft, 1998).

O mecanismo de acção da furazolidona contra a *G. lamblia* não está totalmente elucidado. Provavelmente é reduzida na sua estrutura activa dentro da célula, mas ao contrário do metronidazol, é reduzida por uma NADH oxidase (Brown, 1998; Gardner & Hill, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001). A forma reduzida da furazolidona poderá depois interferir com os constituintes do ADN.

Os sérios inconvenientes do uso da furazolidona incluem: distúrbios gastrointestinais, anemia hemolítica, reacções tipo dissulfiram ao álcool, reacções de hipersensibilidade e coloração castanha da urina. Existe também uma evidência de tumorigenicidade em estudos com roedores (Hill, 1995); hipotensão ortostática e hipoglicémia podem também ocorrer (Minemo & Avery, 2003).

Nas situações de resistência ao metronidazol, como fármaco de segunda linha, a furazolidona pode ser a escolha para a cura. Existem também relatos de uma combinação terapêutica entre a furazolidona e a azitromicina com efeitos inibitórios sinérgicos em *Giardia lamblia* (Crouch, 1990).

2.3. Paromomicina

As experiências clínicas com a paromomicina no tratamento da *Giardia* são limitadas (Nash, 2001).

A paromomicina é um aminoglicosídeo com uma eficácia de 60 a 70% contra a giardiose, muito menos eficaz que os outros fármacos, mas é geralmente utilizado para o tratamento da mulher grávida (Ortega & Adam, 1997), dado não ser absorvido e possuir baixa toxicidade (Kreutner *et al.*, 1981). Os seus efeitos secundários mais comuns são as náuseas, o aumento da motilidade gastrointestinal, a dor abdominal e a diarreia.

O mecanismo de acção da paromomicina inclui a inibição da síntese proteica da *G. lamblia*. Interactua com a subunidade 50s e 30s ribossomal resultando em leituras erradas do codão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) (Gardner & Hill, 2001).

2.4. Albendazol

Os derivados benzoimidazólicos, mebendazol e albendazol, que são muito utilizados como anti-helmínticos de largo espectro, têm sido investigados no que respeita a possível actividade giardicida, com obtenção de bons resultados (Edlind *et al.*, 1990; Meloni *et al.*, 1990; Cedillo-Rivera & Muñoz, 1992; Lemée *et al.*, 2000).

O albendazol é um tratamento alternativo e comparável em eficácia ao metronidazol (Meloni *et al.*, 1990).

O primeiro estudo em larga escala em humanos envolvendo o albendazol efectuou-se em Bangladesh, onde a eficácia média foi 62 a 95%, comparado com os 97% do metronidazol (Hall & Nahar, 1993).

Estes números são consistentes com os recentes pequenos estudos e relatos de falhas nos tratamentos com o albendazol (Upcroft & Upcroft, 2001), mas contrastam com a actividade *in vitro* do albendazol, que é 30 a 50 vezes maior que o metronidazol (Edlind, 1990) ou mesmo cerca de 56 vezes (Cruz *et al.*, 2003). A reduzida solubilidade e o extenso metabolismo deste fármaco pelo fígado em reductases e oxidases, inicialmente no sulfóxido activo mas subsequentemente no metabolito inactivo albendazol – sulfona, são as razões para esta aparente anomalia (Gottschall, 1990).

A eficácia do albendazol no tratamento da giardiose em animais como o gado bovino: boi, vacas, touros, vitelos ou carneiros (Xiao *et al.*, 1996), cães (Meyer, 1998) e ratos (Reynoldson *et al.*, 1991) tem sido documentado.

As crianças que são infectadas com organismos intestinais múltiplos podem ser tratadas com este agente terapêutico de forma eficaz. Existem relatos na Austrália de que o albendazol cura a giardiose e a infecção por acilóstomos com alta eficácia (Reynoldson *et al.*, 1998). Uma vantagem adicional do albendazol no tratamento de crianças é a ausência de anorexia, que é observada com o metronidazol (Misra *et al.*, 1995).

O albendazol é deficientemente absorvido no tracto gastrointestinal devido à sua baixa solubilidade aquosa, contudo a absorção pode ser elevada quando administrado com uma refeição á base de gorduras (Mineno & Avery, 2003).

Os efeitos secundários do albendazol incluem distúrbios gastrointestinais, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, tonturas, vertigens, febre, aumento da pressão intracraniana e alopecia. Após uso prolongado, a elevação reversível no soro das transaminases hepáticas é observada em 15% dos doentes. No entanto, uma vez que os efeitos secundários tendem a ser poucos e moderados, a descontinuação da droga não é geralmente requerida (Venkatesan, 1998). As contra-indicações durante a gravidez devem-se à teratogenicidade.

O mecanismo de acção do albendazol encontra-se descrito de forma mais detalhada no ponto 4.

2.5. Metronidazol

Para o tratamento da giardiose são, normalmente, usados derivados do 5-nitroimidazol: tinidazol, ornidazol, seconidazol e nomeadamente o metronidazol (Upcroft & Upcroft, 1993; Andrews *et al.*, 1995). O metronidazol tem sido o agente quimioterápico de eleição, apesar dos efeitos secundários que lhe estão associados e das resistências que começam a ser conhecidas (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

O metronidazol tendo reconhecida eficácia contra o parasita, sendo produzido a baixo custo e sendo muito bem tolerado é indiscutivelmente a droga

mais usada no combate à giardiose. A possível carcinogenicidade desta droga e o seu uso indiscriminado, que tem vindo a originar o aparecimento de estirpes resistentes, obrigam à procura de alternativas (Wright *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Lemée *et al.*, 2000).

O metronidazol é o agente de primeira linha para o tratamento da giardiose nos EUA se bem que não esteja aprovado pela FDA para o tratamento de rotina da giardiose (Mineno & Avery, 2003).

O metronidazol tem demonstrado ser levemente menos eficaz do que a quinacrina, com uma taxa de cura de 80 a 95%. Contudo, é geralmente eficaz e bem tolerado. É também um bom agente na relação custo – eficácia (Freeman, 1997).

Os efeitos secundários mais comuns incluem perturbações gastrointestinais, dores de cabeça, náuseas, leucopenia e sabor metálico na boca (Roe, 1977). As reacções tipo-dissulfiram podem ocorrer com a ingestão de bebidas alcoólicas. O metronidazol tem também sido descrito como carcinogénico, teratogénico e mutagénico, embora não tenha sido clinicamente provado (Voogd, 1981).

Tal como para o albendazol, o mecanismo de acção do metronidazol será abordado no ponto 4.

2.6. Nitazoxanida

A terapêutica dos protozoários intestinais recebeu um reforço, muito necessário, com a recente demonstração da actividade da nitazoxanida para a criptosporidiose e da sua actividade *in vitro* contra a *Giardia lamblia* entre outros (Petri JR, 2003).

A nitazoxanida foi pela primeira vez sintetizada por Rossignol & Cavier em 1976 e foi utilizada como antiparasitário com base na sua similaridade estrutural com os nitrobenzamidas (Davila-Gutierrez *et al.*, 2002).

A nitazoxanida é um novo fármaco antiparasitário, aprovado pela FDA para o tratamento da diarreia causada pela *Giardia lamblia* em crianças dos 1 aos 11 anos de idade. É um derivado do 5-nitrotiazol que mostrou ter um espectro de

actividade contra protozoários, helmintas e algumas bactérias aeróbias e anaeróbias. Dados clínicos mostraram que a nitazoxanida é bem tolerada e eficaz (Dumbo *et al.*, 1997; Romero Cabello *et al.*, 1998; Abboud *et al.*, 2001; Ortiz *et al.*, 2001; Rossignol *et al.*, 2001).

Um estudo recente afirma a nitazoxanida como um tratamento alternativo seguro nas situações de parasitoses associadas e na amebíase intestinal (Davila-Gutierrez *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram uma alta taxa de eficácia, cerca de 85%, para a *Giardia lamblia* (Ortiz *et al.*, 2001). A nitazoxanida parece ser tão eficaz como o metronidazol em comparações limitadas (Abboud *et al.*, 2001; Anon, 2003), tem também sido descrita como tão eficaz quanto o mebendazol no tratamento da giardiose (Rodríguez-García *et al.*, 1999). A nitazoxanida tem também demonstrado ser segura e eficaz no tratamento da giardiose em crianças (Ortiz *et al.*, 2001).

Em França foi relatado por médicos que doentes infectados com SIDA e com giardiose resistente ao metronidazol e ao albendazol foram tratados com sucesso com nitazoxanida (Abboud *et al.*, 2001). Este resultado sugere que a nitazoxanida pode ser uma boa alternativa para as giardioses resistentes (Cohen, 2005).

Embora todos os seus efeitos adversos sejam suaves e transitórios, os mais comuns são a dor abdominal, a diarreia, os vómitos e as enxaquecas (Cohen, 2005).

A actividade antiprotozoária da nitazoxanida parece resultar da interferência com a PFOR (piruvato ferredoxina oxidoreductase), enzima dependente da reacção de transferência de electrões, que é essencial para o metabolismo anaeróbico (Dunne *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a PFOR da *Giardia lamblia* reduz directamente a nitazoxanida pela transferência de electrões na ausência de ferredoxina (Cohen, 2005).

A nitazoxanida está disponível numa formulação oral (suspensão) de sabor a morango, que pode causar um impacto favorável na adesão dos doentes pediátricos (Cohen, 2005).

3. Falência da Terapêutica

Embora o ciclo de vida de *G. lamblia* seja há muito tempo conhecido, só a partir de 1976 foi possível manter parasitas em cultura (Meyer, 1976), o que veio facilitar e aprofundar enormemente os estudos sobre esta parasitose.

A manutenção de *G. lamblia in vitro* permitiu desenvolver testes de susceptibilidade às drogas antiparasitárias, que vieram comprovar a existência de estirpes com elevada resistência não só ao metronidazol mas também a outras drogas usadas no combate a esta parasitose (Majewska *et al.*, 1991; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

Baseado em aspectos clínicos e parasitológicos de quimioterapia, a definição de resistência aos fármacos foi estabelecida pela OMS em 1973 como: “a capacidade do parasita sobreviver e/ou se multiplicar, apesar da administração e da absorção do fármaco em doses iguais ou mais altas do que aquelas que são normalmente recomendadas dentro dos limites de tolerância do indivíduo” (Basco *et al.*, 2000).

Actualmente, o aumento notável do número de agentes infecciosos resistentes às drogas, como o *Plasmodium* spp. e a *Leishmania* spp. é um dos maiores problemas de saúde pública (Cruz *et al.*, 2003b).

Nos países em desenvolvimento, a contínua morbilidade e mortalidade das doenças infecciosas é uma indicação de que as abordagens correntes são inadequadas. A compreensão da biologia do parasita e da resposta imunitária do hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento de um tratamento eficaz e de estratégias adequadas de prevenção (Petri JR, 2003).

As infecções de *Giardia lamblia* são, algumas vezes, difíceis de tratar sem uma razão aparentemente conhecida (Kulda & Nohylová, 1995; Zaat *et al.*, 1997). A resistência aos antiparasitários frequentemente utilizados é uma explicação possível (Cruz *et al.*, 2003b).

A falência do tratamento anti-giardiose tem sido atribuído à resistência aos nitroimidazóis (Lemée *et al.*, 2000; Abboud *et al.*, 2001), contudo esta tem sido relatada para todos os agentes anti-giardiose, incluindo não só o metronidazol,

como a quinacrina, a furazolidona e o albendazol (Upcroft & Upcroft, 2001). Na giardiose humana, a falência da terapêutica ocorre cada vez com maior frequência devido não só à reinfestação como à resistência do parasita aos fármacos (Lemée *et al.*, 2000).

Numa terapêutica racional é assumido que o uso repetido de doses sub-terapêuticas de um fármaco, seja um 5-nitroimidazol ou um benzimidazol, pode originar populações predominantemente tolerantes aos fármacos e assim levar à falência da terapêutica pela resistência do parasita a esses fármacos. Esta possibilidade é suportada por dados clínicos e experimentais (Arguello-Garcia *et al.*, 2004):

a) Comunidades a receber tratamento anti-helmíntico com mebendazol em doses sub-terapêuticas para a giardiose podem exibir, como consequência, um aumento da taxa de infecção pela *Giardia* (Rousham, 1994);

b) A exposição a doses sub-letais de um fármaco é um método eficaz de obter culturas resistentes ao fármaco *in vitro* (Townson *et al.*, 1992).

As taxas de cura após tratamento farmacológico para os diferentes regimes terapêuticos são, normalmente, superiores a 90%. Contudo, encontram-se descritos alguns casos de insucesso após administrações sucessivas de medicamentos que, embora resultem na eliminação da parasitose na maioria dos casos, não atingem os 100% de eficácia (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

Entre doentes refractários ao metronidazol ou à furazolidona foi demonstrado uma larga escala de susceptibilidade a estas drogas. A taxa de recorrência clínica chegou a ser tão alta como 90% (Zaat *et al.*, 1997).

Por outro lado, as cadeias de *Giardia* resistentes ao metronidazol têm manifestado resistência cruzada ao tinidazol, um análogo nitroimidazol alternativo. Foi também demonstrado que isolados resistentes à furazolidona, por indução *in vitro*, se tornam mais rapidamente resistentes à quinacrina (Upcroft *et al.*, 1996) e que a resistência ao albendazol pode ocorrer mais facilmente em isolados de *Giardia* resistentes ao metronidazol e à furazolidona. Estes fenótipos são considerados como multiresistentes.

Segundo Nash *et al.* (2001) existem seis potenciais causas para o insucesso do tratamento da giardiose, a saber: a reinfecção, a utilização de

esquemas terapêuticos inadequados, a imunossupressão, a resistência ao tratamento, a sequestração na vesícula biliar ou nos ductos pancreáticos e outras razões ainda desconhecidas.

Em situações clínicas normais, a presença de imunossupressão, reinfecção ou sequestração (Soto & Dreiling, 1977; Goldstein *et al.*, 1978) podem ser detectadas. Certos doentes com imunossupressão, tais como os que apresentam hipogamaglobulinemia de grau variável (Ament & Rubin, 1972; Ament *et al.*, 1976; Hermans *et al.*, 1976), ou doenças linfoproliferativas que afectam o tracto gastrointestinal (Waldmann *et al.*, 1974; Ward *et al.*, 1983; Matuchansky *et al.*, 1985), parecem ser anormalmente susceptíveis à giardiose, que com frequência é difícil de tratar.

Embora doentes com Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) positivos e com SIDA possam ser, normalmente, tratados com sucesso (Janoff *et al.*, 1988), em alguns casos desenvolvem complicações que se podem traduzir em risco de vida, não respondendo a parasitose à terapêutica usual (Aronson *et al.*, 2001).

A reinfecção é comum em regiões onde a infecção é fortemente endémica e onde a contaminação ambiental é elevada (Gilman *et al.*, 1988). Nos países desenvolvidos, onde a prevalência da infecção é baixa e a exposição é esporádica, a reinfecção não é, com frequência, uma causa de insucesso do tratamento (Nash *et al.*, 2001).

Situações com doentes que apresentam farmacocinética alterada para os princípios activos giardicidas ou que se encontrem parasitados com estirpes resistentes ao tratamento são raramente documentadas (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

Os factores farmacológicos que são importantes para o sucesso do tratamento não estão ainda determinados (Nash *et al.*, 2001).

Os insucessos do tratamento do metronidazol têm sido relatados em doentes imunodeprimidos, incluindo doentes com SIDA (Dieterich *et al.*, 1994). Alguns especialistas sugerem a repetição do mesmo tratamento com altas doses de metronidazol. Em seis casos de giardiose refractária ao tratamento com metronidazol, a combinação de quinacrina e metronidazol resultou na cura de cinco (Nash *et al.*, 2001). O estudo foi limitado pela ausência de um grupo

controlo e pelo pequeno número de pacientes tratados, mas pode oferecer alguma orientação para o tratamento de casos difíceis (Petri JR, 2003).

Nos casos de resistência são sugeridas as seguintes alternativas: terapêutica com antiparasitário alternativo, ciclos múltiplos e/ou combinados de princípios activos standard, aumento do tempo de tratamento, aumento da dose, ou aumento da dose e do tempo de tratamento (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001).

A compreensão dos mecanismos de resistência aos fármacos em *Giardia lamblia* pode ser uma excelente contribuição para evitar a sua ocorrência. O desenvolvimento de novas drogas pode ser outra opção, com novas abordagens à quimioterapia anti-giardiose (Mineno & Avery, 2003).

4. Mecanismos de Acção e de Resistência ao Metronidazol e ao Albendazol

Actualmente, o metronidazol continua a ser o antiparasitário mais utilizado clinicamente no combate à giardiose em todo o mundo, sendo o albendazol, comparativamente ao metronidazol, uma boa alternativa em eficácia (Meloni, 1990) e nas situações de falha do “tratamento standard”, e com muito poucos efeitos secundários (Ortega & Adam, 1997). Assim, optou-se por abordar de forma mais aprofundada os seus mecanismos de acção bem como os mecanismos, descobertos até ao momento, responsáveis pela resistência da *Giardia lamblia* a estes dois importantes fármacos.

4.1. Mecanismo de Acção e de Resistência ao Metronidazol

Estudos recentes de parasitas sensíveis ao metronidazol sugerem que estes eucariotas apresentam novas adaptações ao seu nicho anaeróbico que se encontram relacionadas com a sensibilidade apresentada aquele nitroimidazol:

a) A *Giardia* e as amibas não apresentam enzimas da fermentação, nomeadamente a lactatodehidrogenase e a piruvatodescarboxilase, que estão presentes em fungos e outros eucariotas (Tsuji *et al.*, 1994; Mucke *et al.*, 1996);

b) Os parasitas do lúmen intestinal parecem ter adquirido, por transferência, genes bacterianos que codificam enzimas fermentativas (Smith *et al.*, 1992; Rosenthal *et al.*, 1997), que incluem uma ferrosulfoproteína denominada piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR), envolvida na activação do metronidazol (Narikawa, 1986; Hrdy & Muller, 1995; Townson *et al.*, 1996);

c) Todos estes parasitas não apresentam mitocôndrias, mas têm um gene que codifica uma proteína homóloga da proteína mitocondrial 60-kDa de choque térmico (Hsp60), o que indicia que a *Giardia* terá perdido as suas mitocôndrias durante o processo evolutivo (Soltys & Gupta, 1994; Bui *et al.*, 1996; Gillin *et al.*, 1996; Roger *et al.*, 1998).

É sobre estas características que assenta a citotoxicidade selectiva do metronidazol, que resulta do facto deste princípio activo necessitar de ser reduzido para uma forma activa, a forma citotóxica, e faz com que o metronidazol seja atractivo para fins terapêuticos (Johnson, 1993).

O metronidazol entra nos microrganismos anaeróbios ou microaerófilos e nas células anóxicas ou hipóxicas por difusão passiva, o seu grupo nitro é reduzido por uma via metabólica de baixo potencial redox, que existe exclusivamente em bactérias e protozoários anaeróbios ou microaerófilos (Johnson, 1993; Falagas & Gorbach., 1995). O grupo nitro da droga actua como aceitador de electrões das proteínas de transporte de electrões com potenciais redox negativos suficientemente baixos (p.e. flavoproteínas nas células de mamíferos e ferredoxinas (Fd) ou o seu equivalente nos protozoários e bactérias), previamente reduzidas por PFOR (Townson *et al.*, 1994a; Falagas & Gorbach 1995). Esta reacção faz diminuir a concentração intracelular do princípio activo, criando um gradiente que promove a difusão do metronidazol para o interior dos organismos susceptíveis (Falagas & Gorbach, 1995). A PFOR é inactivada pelo oxigénio, de tal modo que a sensibilidade do microrganismo ao metronidazol está relacionado quase de 1:1 com a presença de PFOR activada (Narikawa, 1986). No Homem, a piruvatodehidrogenase substitui a PFOR e somente se forma

NADH em lugar de Fd reduzida (Samuelson, 1999). O metronidazol é também reduzido e activado em tecidos pouco oxigenados, como no caso de abcessos ou centros de necrose nos tumores (Koch *et al.*, 1997).

As enzimas da via fermentativa, na *Giardia* e nas amibas, estão localizadas no citosol (Muller, 1992; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998; Sanchez, 1998), iniciando-se a fermentação do piruvato a etanol, dióxido de carbono (CO₂) e acetato com a PFOR. A PFOR cataliza a descarboxilação oxidativa do piruvato, a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), produzindo CO₂ e reduzindo a ferredoxina. Na ausência de metronidazol e de oxigénio como aceitador de electrões, a ferredoxina reduzida doa o seu electrão ao dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) (Bui & Johnson, 1996). Alguns parasitas luminais entre os quais a *Giardia*, convertem acetil-CoA em acetaldeído via uma acetaldeídodehidrogenase CoA-dependente (ALDHE), ausente no Homem (Sanchez, 1998). A acetaldeídodehidrogenase CoA independente (ALDH) está presente no Homem e localiza-se nas mitocôndrias (Mays *et al.*, 1998). A *Giardia*, tal como as amibas, convertem acetaldeído em etanol via uma de três álcooldehidrogenases (ADHs), que incluem uma ADHE NAD-dependente e uma ADH1 e ADH3 NADP-dependentes (Sanchez, 1998). Estas vias podem constituir sítios alvo para novos princípios activos à semelhança do que está já descrito para as amibas (Yong *et al.*, 1996).

O metronidazol reduzido, que é citotóxico mas de vida curta, interacciona com o ADN causando a perda da sua estrutura helicoidal, quebra das cadeias e consequente inibição da síntese de ácido nucleico provocando morte celular (Borst & Ouellette, 1995; Freeman *et al.*, 1997). Para além disso, pensa-se que estes intermediários tóxicos interaccionam com outros componentes celulares como proteínas e membranas, resultando daí danos celulares irreparáveis (Freeman *et al.*, 1997). Esta relação entre os danos provocados no ADN e a redução do R-NO₂ do metronidazol já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* (Johnson, 1993).

O oxigénio é um aceitador alternativo de electrões que parece competir com o metronidazol (Johnson, 1993). Ensaio conduzidos na ausência ou presença de oxigénio, usando anaeróbios facultativos, revelam uma concentração inibitória mais elevada na presença de oxigénio, comprovando que o oxigénio

interfere no efeito antimicrobiano do metronidazol (Johnson, 1993). É concebível que isto ocorra via reoxidação do radical R-NO₂ ou por competição directa do oxigénio por electrões necessários para reduzir o metronidazol. No caso de *Giardia* este problema não se põe, porque este parasita é microaerófilo, desenvolvendo-se *in vitro* em meio axénico (Adam, 1991), tendo os trofozoítos uma sobrevivência muito reduzida num ambiente com uma concentração elevada de oxigénio (note-se que a cisteína adicionada ao meio de cultura fornece uma protecção parcial contra o efeito do oxigénio) (Adam, 1991).

A resistência ao metronidazol é normalmente, observada em organismos que são considerados classicamente susceptíveis, como *T. vaginalis*, *Bacillus fragilis* (Falagas *et al.*, 1995) e *Helicobacter pylori* (Megraud & Doermann, 1998). Uma prova do mecanismo de resistência dos 5-nitroimidazóis em *Giardia*, similar ao observado na *T. vaginalis* (Brown *et al.*, 1999), *Bacillus fragilis* (Townson *et al.*, 1994b) e *Helicobacter pylori* (Van der Wouden *et al.*, 2001), é a diminuição da actividade da PFOR com a resultante diminuição da activação da droga (Townson *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 1998).

Em contraste com a *T. vaginalis*, em que a síntese da enzima é completamente “downregulated” em células de alta resistência (Brown *et al.*, 1999), a actividade da PFOR em *Giardia* é diminuída em apenas duas a cinco vezes, sendo improvável que sozinha justifique os altos níveis de resistência observados *in vitro* (Townson *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2003). Desta forma, pode-se concluir que outros mecanismos de resistência estão envolvidos (Townson *et al.*, 1996). Estes incluem a diminuição dos níveis de ferredoxina nas células resistentes ao metronidazol (Liu *et al.*, 2000), a actividade de oxidoreductases alternativas (ORs) e outras funções reguladoras *in vivo* (Wright *et al.*, 2003).

A alternativa OR em *Giardia* é o chamado butirato oxidoreductase (BOR), dado que usa o 2-ceto butirato mais eficientemente do que o piruvato, porém, aparentemente, não pode reduzir a ferredoxina da *Giardia* (Wright *et al.*, 2003). O BOR é expressado em excesso nos parasitas resistentes ao metronidazol quando comparado com a estirpe parental sensível (Townson *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 1999).

Foram também observadas alterações à entrada dos fármacos em algumas linhas resistentes, que fazem parte do bloqueio, alternativamente um mecanismo de efluxo activo é susceptível de operar (Upcroft, 1994).

A resistência ao metronidazol em protozoários do lúmen intestinal tem tido um lento desenvolvimento e ainda não se tornou um importante problema clínico. Três razões podem ser indicadas para tal:

a) A poliploidia, que ao existir implica que uma alteração num único gene não seja suficiente para conferir resistência ao agente quimioterápico (Adam *et al.*, 1988);

b) Estes parasitas terem poucas alternativas metabólicas ao PFOR, que activa o metronidazol; no que respeita à *Giardia* e às amibas, elas não apresentam lactatodehidrogenase nem piruvatodescarboxilase, presente noutros eucariotas (Reeves, 1984; Tsuji *et al.*, 1994; Mucke *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998), todavia diminuições na actividade da PFOR e alterações na permeabilidade da membrana estão associadas com o processo de resistência em *Giardia* (Townson *et al.*, 1994b) não sendo ainda plenamente conhecidos;

c) Um aumento da expressão de genes “multidrug resistance” (*mdr*), que conferem resistência a agentes com carácter hidrofóbico mas não ao metronidazol (Borst & Ouellette, 1995; Ghosh *et al.*, 1996).

4.2. Mecanismo de Acção e de Resistência ao Albendazol

A descoberta por Brown *et al.* (1961) de que o tiabendazol possuía potente actividade contra os nemátodes gastrointestinais incentivou o desenvolvimento dos benzimidazóis como agentes anti-helmínticos de largo espectro, utilizados no Homem. Das centenas de derivados testados três salientaram-se pela sua actividade, o tiabendazol, o mebendazol e o albendazol, encontrando-se a utilização do primeiro na medicina humana em declínio devido à sua relativa toxicidade (Tracy & Webster, 1991). O albendazol [5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il] é um benzimidazol carbamato recente, de utilização generalizada contra helmintas e preferido para o tratamento da cisticercose (Del Brutto *et al.*, 1993) e da hidatidose (Horton, 1989). À semelhança do mebendazol parece possuir certa

actividade giardicida tendo-se mostrado eficaz no tratamento de alguns casos no Homem (Hall & Nahar, 1993; Pungpak *et al.*, 1996).

A absorção ao nível do intestino humano é variável e máxima quando em presença de alimentos ricos em lípidos, sendo rapidamente metabolizado em sulfóxido no fígado (Venkatesan, 1998). Este metabolito é dotado de potente actividade antiparasitária e é excretado, principalmente, pela urina mas também na bÍlis (Gottschall *et al.*, 1990). O sulfóxido de albendazol e a sulfona de albendazol são os dois principais metabolitos resultantes da metabolização do albendazol, sendo produzidos sequencialmente (Venkatesan, 1998) e ocorrendo a sulfonação em pequena quantidade (Galtier *et al.*, 1986). O albendazol pode ser oxidado, naturalmente, por incubação a 37°C, nas formas sulfóxido (71% de oxidação) e sulfona (7% de oxidação) (Fetterer & Rew, 1984).

Quando Oxberry *et al.* (2000) expuseram trofozoÍtos de *G. lamblia* ao albendazol *in vitro*, detectaram esta forma na região média-dorsal, a forma sulfóxido na região posterior-dorsal e a forma sulfona em agregados junto aos corpúsculos medianos.

Tratou-se da primeira evidência de que *G. lamblia* possuía via(s) metabólica(s) que lhe permite metabolizar o albendazol. É aceite que a sulfoxidação do albendazol, no Homem, ocorre no fígado e envolve um sistema de enzimas NADPH-dependentes, sendo desenvolvida pelo citocromo P-450 e pelo Flavina-adenina-dinucleótido (FAD) contendo monoxigenases (Venkatesan, 1998).

O potencial do albendazol contra *G. lamblia* envolve a interacção do principio activo com tubulinas e/ou giardinas do citoesqueleto (Reynoldson *et al.*, 1992) que representam sÍtios alvo. Contudo, não se observaram alterações na actividade flagelar após exposição de trofozoÍtos ao albendazol, enquanto se observou uma actividade selectiva pela tubulina do disco ventral ou pelas giardinas que lhe estão associadas (Edlind *et al.*, 1990; Meloni *et al.*, 1990). A integridade dos microtúbulos, conjuntamente com a presença de actina, miosina, α -actina e tropomiosina para a integridade do disco ventral é fundamental para a sobrevivência do parasita (Feely *et al.*, 1982).

O albendazol inibe a aderência de *G. lamblia* sem aparente efeito no funcionamento dos flagelos, o que sugere a possibilidade da tubulina flagelar necessitar de ligação local para os benzimidazóis ou da tubulina dos flagelos e do disco serem distintas (Adam, 1991). A perda da aderência, apesar do funcionamento dos flagelos parecer intacto, mostra que o funcionamento dos flagelos por si só não é factor suficiente para garantir a aderência (Adam, 1991).

O albendazol afecta também o metabolismo energético, como foi demonstrado por Hall *et al.* (1992) que observou alterações nos produtos finais de diversas vias metabólicas. Utilizando isolados de *G. lamblia* geneticamente distintos, estes investigadores observaram uma redução na produção de etanol e um aumento nas quantidades de acetato e de alanina produzidos.

A disrupção da ligação das células e a rápida e grosseira distorção da estrutura celular da *Giardia* em resposta ao tratamento com benzimidazóis indicam que os microtúbulos são o alvo destes fármacos, como foi ilustrado por Chavez, Cedillo-Rivera e Martinez-Palomo (Chavez *et al.*, 1992).

Consistente com o mecanismo de acção dos benzimidazóis, a resistência ao albendazol, que é o benzimidazol recomendado para o tratamento da giardiose, envolve o aumento dos corpúsculos medianos, implicando desta forma o citoesqueleto no mecanismo de resistência. Contudo, não existem mutações específicas no gene β -tubulina, similar ao que foi descoberto nos helmintas, com o aminoácido da posição 200 associado com a resistência aos benzimidazóis (Upcroft *et al.*, 1996).

5. Indução de Resistência *In Vitro*

Existe falta de informação acerca das estirpes de *Giardia lamblia* que parasitam diferentes populações. As dificuldades do isolamento e cultivo dos trofozoitos são, provavelmente, a principal razão (Cruz *et al.*, 2003a).

Contudo, os estudos com *Giardia* sofreram um incremento significativo após o primeiro isolamento e axenização de uma estirpe obtida a partir de um paciente de Portland nos EUA em 1976 (Bingham *et al.*, 1979). A introdução de

métodos para o cultivo axénico de *G. lamblia* aperfeiçoou os meios de cultura e desenvolveu as técnicas para o enquistamento *in vitro* deste parasita, tornando possível a obtenção de isolados axénicos oriundos de várias regiões geográficas (Cruz *et al.*, 2003a).

Pelo facto de existirem poucas alternativas terapêuticas e uma prescrição indiscriminada de antiparasitários, são cada vez mais os casos de resistência registados, levando à necessidade de recorrer a outros fármacos.

No que respeita à existência de uma correlação consistente entre a resistência/sensibilidade determinada *in vitro* e os casos de tratamento não conseguido (Gardner & Hill, 2001) não foi ainda verificada, o que deixa ainda em aberto se os casos de resistência declarada são efectivamente reais, tanto mais que não existe ainda um ensaio normalizado para avaliação da sensibilidade de trofozoítos de *Giardia in vitro*, ou *in vivo* em animais (Nash *et al.*, 2001).

A constatação de resistências, quer ao metronidazol quer ao albendazol, já observadas noutros países (Farbey *et al.*, 1995; Lemée *et al.*, 2000), ainda não se encontra descrita para Portugal. Foi, contudo, já sugerido (Upcroft & Upcroft, 1993) que o metronidazol apesar de ser um princípio activo eficaz e económico, actualmente corre o risco de se tornar obsoleto (Farbey *et al.*, 1995) face a novos agentes quimioterápicos que têm surgido e que se apresentam praticamente desprovidos de efeitos secundários.

O albendazol surge assim bem posicionado como alternativa promissora, em face dos resultados dos ensaios realizados *in vitro* (Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Lemée *et al.*, 2000) e *in vivo* (Hall & Nahar, 1993; Pungpak *et al.*, 1996).

A grande vantagem dos estudos *in vitro* é que os parasitas parentais e sensíveis e os parasitas resistentes seleccionados são geneticamente singénicos, desta forma a resistência é desenvolvida no mesmo património genético, por este motivo, mecanismos de alteração ou alternativos não complicam as interpretações mecânicas, uma situação que surgiu com a malária (Foote & Cowman, 1994; Rathod *et al.*, 1997; Upcroft, 1998; Upcroft & Upcroft, 2001).

Uma segunda vantagem dos estudos *in vitro* com os protozoários anaeróbicos como a *Giardia* é que estes não têm nenhum estadio sexual

conhecido, assim a resistência multifactorial ou poligénica característica pode surgir no mesmo parasita e pode ser monitorizada a cada momento e desenvolver-se aumentos da concentração dos fármacos.

A terceira vantagem é a capacidade para determinar, pormenorizadamente, a resistência do parasita antes de esta surgir como um problema epidemiológico ou de saúde pública em larga escala (Upcroft, 1998; Upcroft & Upcroft, 2001).

Talvez a única desvantagem seja a falta de interacção parasita/hospedeiro no desenvolvimento da resistência, muitas vezes, no entanto, qualquer interacção da manutenção ou modulação da resistência pode ser verificada mais tarde com estudos *in vivo* (Upcroft & Upcroft, 2001).

Além disso, os mecanismos descobertos em laboratório podem depois ser facilmente analisados pelo seu aparecimento nos isolados clínicos e os patamares intermédios de resistência podem ser comparados pela sua probabilidade de progredir a níveis mais elevados (Upcroft, 1998; Upcroft & Upcroft, 2001).

Estudos laboratoriais têm desenvolvido metodologias de indução de resistência às drogas de forma a complementar as análises clínicas dos isolados de *Giardia duodenalis* (Upcroft, 1998, Upcroft & Upcroft, 2001).

5.1. Metodologias de Indução de Resistência

O desenvolvimento da indução de resistência através de vários regimes de fármacos incluindo aumento da concentração a níveis sub-letais ou a exposições curtas e múltiplas a níveis letais, administrados com ou sem mutagénese, têm fornecido consideráveis informações acerca da capacidade dos parasitas para fortalecer a sua resistência e protecção, bem como dos mecanismos envolvidos (Cerkasovova *et al.*, 1988a; Cerkasovova *et al.*, 1988b; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1994b; Upcroft, 1994; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b; Brown *et al.*, 1998; Upcroft, 1998; Brown *et al.*, 1999; Kulda, 1999; Upcroft *et al.*, 1999; Upcroft & Upcroft, 1999; Upcroft & Upcroft, 2001).

A resistência *in vitro* tem sido demonstrada para quatro grandes grupos de fármacos: nitroimidazóis (metronidazol), nitrofuranos (furazolidona), acridinas (quinacrina) e benzimidazóis (albendazol) (Upcroft, 1998).

Na bibliografia encontram-se muito poucos artigos sobre indução de resistência em *G. lamblia*.

Adoptando a terminologia de Townson *et al.* (1992), nos seus trabalhos sobre indução de resistência ao metronidazol e à furazolidona, pode-se classificar, de acordo com o tipo de exposição dos trofozoitos aos fármacos, as metodologias de indução de resistência utilizadas, com algumas variações, em três tipos: metodologia de exposição contínua ou constante, metodologia de exposição intermitente e metodologia com mutagénese por exposição à luz ultravioleta (UV).

Embora, na nossa opinião, se possa estender a classificação anteriormente referida a todos os trabalhos *in vitro* de indução de resistência em *Giardia lamblia*, existem diferenças significativas entre todos eles que dificultam não só a sua classificação como também o estabelecimento de um procedimento padrão dentro de cada metodologia.

Variáveis tais como o isolado e o princípio activo utilizado, as concentrações iniciais e subsequentes de exposição e o tempo de exposição aos fármacos, entre outras, diferem de estudo para estudo.

Na Tabela 1 encontram-se descritos todos os trabalhos sobre indução de resistência em *G. lamblia*, com referência aos princípios activos, às metodologias adoptadas bem como aos isolados e às concentrações de indução iniciais e finais utilizadas.

De referir que o primeiro trabalho de indução de resistência em *G. lamblia* data de 1988 e é da autoria de Boreham *et al.*, não existindo descrito nenhum trabalho nesta área desde 1996, ano em que se publicaram três artigos, como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1 – Metodologias de Indução de Resistência em *G. lamblia*

PRINCÍPIO ACTIVO	METODOLOGIA DE INDUÇÃO	ISOLADO	CONCENTRAÇÃO		REFERÊNCIA
			INICIAL (µM)	FINAL (µM)	
Metronidazol	Contínua	BRIS/83/HEPU/106	4,96 (IC ₅₀ = 0,86)	4,96 (IC ₅₀ = 6,4)	Boreham <i>et al.</i> , 1988b
		BAC2-M2	4,65 b)	11,7	Townson <i>et al.</i> , 1992
		OAS1-M2	3,75 b)		
		WB1B-M2	5,75 b)		
		BRIS/87/HEPU/713-M2	4,25 b)		
	Intermitente	BAC2-M1	0,93 a)	397	
		OAS1-M1	0,75 a)		
		WB1B-M1	1,15 a)		
		BRIS/87/HEPU/713-M1	0,85 a)		
	Mutagéneses UV	WB1B-M3		115	
		BRIS/87/HEPU/713-M3		85	
Furazolidona	Contínua	BAC2-F2	4,5 b)	8	
		OAS1-F2	4,5 b)		
		BRIS/87/HEPU/713-F2	7 b)		
	Intermitente	BAC2-F1	0,90 a)	45	
		OAS1-F1	0,90 a)	40	
		WB1B-F1	0,50 a)		
		BRIS/87/HEPU/713-F1	1,40 a)	38	
	Mutagéneses UV	BAC2-F3		34	
		OAS1-F3		56	
Quinacrina	Contínua	WB-1B	1	20	Upcroft <i>et al.</i> , 1996a
		BRIS/89/HEPU/1065			
		BRIS/93/HEPU/1706			
		BRIS/87/HEPU/713-M3			
		WB1B-M3			
		BAC2-F3			
		OAS1-F3			
Albendazol	Contínua	WB-1B	0,1	0,1	Upcroft <i>et al.</i> , 1996b
		BRIS/89/HEPU/1065			
		BRIS/91/HEPU/1411			
		BRIS/83/HEPU/106			
		WB1B-M3			
	Intermitente	WB, ATCC 30957	0,23	9	Lindquist, 1996

a) ID₅₀

b) 5x ID₅₀

5.1.1. Metodologia de Exposição Contínua ou Constante

A metodologia contínua ou constante, com pequenas variações, consiste em expor os trofozoitos de *Giardia lamblia* a concentrações sub-letais dos fármacos, normalmente o valor da IC₅₀, de forma continuada e diária durante um determinado período de tempo. Nesta metodologia, sempre que se verifica uma estabilização das culturas a uma determinada concentração do princípio activo, esta aumenta ligeiramente para uma nova concentração que permita a sobrevivência e o crescimento das culturas. A indução de resistência termina quando se atinge uma concentração a partir da qual não é possível estabilizar as culturas ou uma concentração considerada, pelos autores, com indicadora de resistência ao fármaco utilizado.

A metodologia contínua ou constante é a mais utilizada para induzir resistência aos antiparasitários em *Giardia lamblia*.

De seguida, de forma resumida, passa-se a descrever os trabalhos laboratoriais de indução de resistência que recorreram a esta metodologia e que constam da Tabela 1.

O primeiro trabalho, onde se encontra descrito a indução de resistência em laboratório com a *Giardia lamblia*, é da autoria de Boreham *et al.* (1988), com a utilização de uma metodologia, que se pode designar por contínua, para induzir resistência ao metronidazol. Durante 66 semanas Boreham *et al.* cultivaram um isolado de *Giardia intestinalis* (BRIS/83/HEPU/106) em meio TYI-S-33 contendo concentrações sub-letais de metronidazol (4,96µM). No final, a sensibilidade deste isolado ao metronidazol diminuiu cerca de 8 vezes. Verificaram também, após a remoção da droga, que esta resistência era instável uma vez que o isolado de *Giardia* regressou gradualmente à sua sensibilidade original, não apresentando nenhuma diferença relativamente aos valores de sensibilidade iniciais, ao fim de 22 semanas.

Em 1992, Townson *et al.* induziram em laboratório resistência ao metronidazol e à furazolidona utilizando quatro isolados de *Giardia lamblia* de diferentes hospedeiros e diferentes proveniências geográficas. Para esta indução de resistência foram utilizadas os três tipos de metodologias: a exposição

intermitente e a exposição constante aos fármacos, e a indução de mutagênese pela exposição à luz ultravioleta (UV).

Na exposição constante ou contínua, as oito linhas de trofozoitos de *Giardia* resistentes, que resultaram da exposição intermitente, foram submetidas a uma concentração contínua dos fármacos durante 30 semanas. A concentração inicial para cada isolado foi de cinco vezes o valor de ID₅₀, sendo ao fim de 13 semanas aumentada para 11,7µM para o metronidazol e para 8µM para a furazolidona.

Em 1996 foram publicados dois artigos de Upcroft *et al.* sobre indução de resistência em *Giardia*. Em ambos, a exposição contínua foi a metodologia utilizada para induzir a resistência.

Um destes artigos abordava a indução de resistência ao albendazol em cinco isolados de *Giardia lamblia*, tendo um deles (WB1B-M3) sido previamente exposto e resistido a altas concentrações de metronidazol através dos trabalhos de Townson *et al.* (1992), referido anteriormente. Os trofozoitos foram sujeitos inicialmente a uma exposição contínua de albendazol a 0,1µM, que não era letal para exposições curtas aos isolados utilizados. Sempre que as culturas estabilizavam na concentração anterior esta aumentava mais 0,1µM. Os trofozoitos que cresceram acima de 0,2µM foram considerados resistentes ao albendazol. Dos cinco isolados utilizados em dois (WB-1B e BRIS/89/HEPU/1065) não foi possível induzir a resistência ao albendazol por impossibilidade de estabilização das culturas. Outros dois isolados (BRIS/91/HEPU/1411 e BRIS/83/HEPU/106) conseguiram suportar a exposição contínua de albendazol a 0,2µM durante cerca de 245 dias, sendo posteriormente sujeitos a concentrações superiores até 0,8µM para um isolado e 0,7µM para outro durante algum tempo, embora não indefinidamente.

Segundo Upcroft *et al.* (1996b), o isolado resistente ao metronidazol (WB1B-M3) adaptou-se mais rapidamente à exposição contínua de albendazol e sobreviveu a um nível bastante mais elevado que os outros isolados, cerca de 2µM durante vários meses, perfazendo no total três anos de indução de resistência.

Esta resistência cruzada foi confirmada e reforçada pela exposição do isolado resistente durante 48h ao parabendazol, que se mostrou mais efectivo *in vitro* ao fármaco (10 μ M) que os trofozoitos sensíveis (0,75 μ M).

Segundo Upcroft *et al.* (1996b), estes resultados contribuíram para aumentar as preocupações acerca da insuficiência do arsenal terapêutico dos fármacos anti-protozoários.

O outro artigo de Upcroft *et al.* (1996a), sobre indução de resistência em *Giardia duodenalis* utilizava como antiparasitário a quinacrina.

A resistência à quinacrina foi induzida em três estirpes laboratoriais (WB-1B, BRIS/89/HEPU/1065 e BRIS/93/HEPU/1706) e em quatro linhas resistentes, duas ao metronidazol (WB1B-M3, BRIS/87/HEPU/713-M3) e duas à furazolidona (BAC2-F3 e OAS1-F3), que resultaram dos trabalhos de Townson *et al.* (1992), conforme consta da Tabela 1.

A inclusão das estirpes resistentes a outros fármacos teve como objectivo a avaliação da resistência cruzada e o seu grau de adaptação à quinacrina.

Os trofozoitos foram inicialmente submetidos a uma exposição contínua de 1 μ M de quinacrina. Sempre que se adaptavam a uma determinada concentração esta era aumentada em 1 μ M permitindo que o parasita se restabelecesse em cada uma delas. Os trofozoitos que cresceram em concentrações acima de 5 μ M foram considerados resistentes.

Das três estirpes laboratoriais usadas apenas duas (WB-1B e BRIS/89/HEPU/1065) estabilizaram a 20 μ M, não ultrapassando a outra (BRIS/93/HEPU/1706) a concentração de 7–8 μ M. As duas linhas resistentes ao metronidazol tiveram comportamentos distintos: uma (WB1B-M3) não se comportou de forma significativamente diferente das estirpes laboratoriais quanto ao número de dias utilizado para desenvolver resistência à quinacrina e apenas se estabilizou à concentração de 10 μ M; a outra (BRIS/87/HEPU/713-M3) adaptou-se mais rapidamente à quinacrina contudo, apenas se estabilizou a 7–8 μ M. Quanto às duas linhas resistentes à furazolidona, ambas se adaptaram rapidamente a 10 μ M, aproximadamente três vezes mais do que as outras linhas testadas.

Como conclusão final desta indução de resistência com quinacrina os autores afirmam que a resistência múltipla foi mais marcante com as linhas resistentes à furazolidona do que com as linhas resistente ao metronidazol.

5.1.2. Metodologia de Exposição Intermitente

A metodologia de exposição intermitente, tal como o próprio nome indica, consiste em submeter os trofozoitos de *Giardia lamblia* a exposições por períodos curtos, normalmente 24 ou 48 horas, a concentrações consideradas letais dos princípios activos.

Em 1992, Townson *et al.* utilizaram a exposição intermitente para induzir em laboratório resistência ao metronidazol e à furazolidona, recorrendo aos mesmos isolados referidos na exposição contínua e que constam da Tabela 1.

Na exposição intermitente, os trofozoitos foram sujeitos aos fármacos durante 48h e posteriormente foi-lhes permitido recuperar até à próxima exposição. A concentração inicial foi o valor de ID₅₀ de cada isolado, aumentando gradualmente de forma a permitir a sobrevivência a cerca de 10-20% dos trofozoitos. Após 13 semanas, a exposição foi reduzida para 24h durante mais 17 semanas. A concentração final da exposição intermitente para o metronidazol foi de 397µM em todos os isolados, enquanto para a furazolidona a concentração final foi de 40µM para dois isolados (OAS1-F1 e WB1B-F1), de 45µM para um isolado (BAC2-F1) e de 38µM para outro (BRIS/87/HEPU/713-F1), conforme descrito na Tabela 1.

Em 1996 Lindquist conseguiu induzir resistência ao albendazol utilizando, segundo ele, uma metodologia semelhante à descrita nos trabalhos de Townson *et al.* (1992) que, embora confusa, se poderá classificar como de exposição intermitente.

Assim, cultivou um isolado de *Giardia lamblia* (WB, ATCC 30957) em meio Keister BI-S-33 modificado e sujeitou-o ao albendazol semanalmente. A exposição inicial foi a IC₉₅ (0,23µM) durante 24h, permitindo depois o seu crescimento até atingir a monocamada, seguindo-se uma nova exposição à IC₅₀

(0,12µM). Depois disto foram utilizadas, de forma empírica, altas concentrações de albendazol que se mantinham sempre que as culturas eram viáveis. A concentração final foi de 9µM. A estabilidade da resistência foi testada pelo cultivo das culturas resistentes sem adição de fármaco durante pelo menos uma semana. Estas culturas foram depois expostas ao albendazol e monitorizadas. A exposição a longo prazo foi também avaliada pela incubação das culturas resistentes a 4,2µM de albendazol e observadas a cada 24h, tendo-se verificado, em termos de duração, uma limitação desta resistência visto que as culturas resistentes apenas resistiram a exposições de duração inferior a 96h.

Lindquist constatou também que a resistência era transitória, começando a perder-se após o crescimento das culturas sem exposição ao albendazol, contudo esta podia ser rapidamente recuperada.

Segundo Lindquist, que usou as culturas resistentes e as culturas controlo para testar a capacidade dos trofozoitos enquistarem *in vitro* utilizando o método de Gillin *et al.* (1989), o enquistamento dos trofozoitos resistentes pode ser devido ao facto de estes conservarem, de reterem na memória e de transmitirem a resistência.

5.1.3. Metodologia de Exposição à Luz Ultravioleta (UV)

Esta metodologia apenas foi utilizada por Townson *et al.* (1992) para induzir resistência em *Giardia lamblia*.

Como 3ª metodologia, para além da intermitente e da contínua, Townson *et al.* ressuspenderam os trofozoitos de *Giardia lamblia* em tampão fosfato salino (PBS), colocaram-nos em disco de Petri de 5cm de diâmetro e expuseram-nos à luz UV (258nm) a uma intensidade de 3-5J/m² durante 10min. De seguida, os trofozoitos recuperaram durante 48h e foram expostos à furazolidona a concentrações cinco ou dez vezes o valor de IC₅₀ ou a cem vezes, no que diz respeito ao metronidazol.

A esta metodologia apenas resistiram duas linhas de metronidazol, com uma concentração final do fármaco de 85µM (BRIS/87/HEPU/713-M3) e 115µM

(WB1B-M3), e duas de furazolidona, com uma concentração final de 34µM (BAC2-F3) e 56µM (OAS1-F3), conforme se pode verificar na Tabela 1.

6. Considerações Finais

A indução *in vitro* de resistência em *Giardia*, com incremento de acréscimos da concentração da droga, demonstrou uma relativa facilidade para gerar isolados resistentes sobre diversas pressões seleccionadas, (Upcroft & Upcroft, 1993; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1994b; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b). A excepção foi Chavez *et al.* (1992), que utilizando diferentes concentrações de albendazol e mebendazol (benzimidazóis), falharam todas as suas tentativas para cultivar este parasita em meio contendo concentrações sub-letais dos fármacos atrás referidos. Verificaram que, mesmo a baixas concentrações, estas provocavam grosseiras e exuberantes alterações morfológicas nos trofozoitos de *Giardia lamblia* após exposição durante 24h.

A indução *in vitro* de resistência em *Giardia* tem advertido para as capacidades dos parasitas, de várias formas (Upcroft, 1998). Estas incluem a definição de mecanismos de resistência ao nível molecular (Upcroft & Upcroft, 1993; Townson *et al.*, 1994a; Upcroft, 1994; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b; Brown *et al.*, 1998), de percursos comuns de resistência (Upcroft & Upcroft, 1993; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b) e de activação dos fármacos (Townson *et al.*, 1994a; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996), do número de passos enzimáticos envolvidos (Townson *et al.*, 1994a; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b; Brown *et al.*, 1998), dos percursos coordenadamente regulados e da múltipla resistência às drogas (Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b).

Estes estudos são complementados pela investigação de forma a circunscrever estes eventos e a desenvolver novos fármacos e sistemas de

libertação que possam superar os mecanismos de resistência conhecidos. Além disso, a abordagem racional ao desenho dos fármacos pode ser presentida.

Uma colecção abundante de parasitas em diferentes estadios de indução de resistência pode ser bastante útil para o estudo do desenvolvimento da sua adaptação / resistência aos fármacos, bem como para a avaliação sequencial desta adaptação no sentido de verificar se esta é resultante de uma diferenciação genética ou de uma adaptação morfofuncional ou somática.

Esta colecção pode também ser bastante útil para o estudo genético de isolados resistentes às drogas (Lipsitch & Levin, 1997).

A obtenção de isolados resistentes é fundamental para a compreensão dos mecanismos de resistência e é também essencial para inspirar a terapêutica e as estratégias de design de novas drogas (Rasmussen *et al.*, 1997).

Este trabalho teve como objectivo principal proceder ao levantamento de todos os trabalhos sobre indução de resistência *in vitro* em *Giardia lamblia* bem como de todas as diferentes metodologias utilizadas.

A deficiente e exígua informação encontrada em alguns artigos sobre a metodologia usada para a indução de resistência e sobre os resultados obtidos, e a diversidade de metodologias utilizadas bem como as diferenças significativas entre estas, dificultaram sobremaneira a compreensão e o estabelecimento de normativas para a indução de resistência *in vitro* e a comparação efectiva dos resultados obtidos e das metodologias usadas.

Outra observação que se pode apontar a todos os artigos sobre esta temática é a ausência de qualquer informação acerca da variação dos valores da IC₅₀ e da MLC ao longo do processo de indução de resistência. É que, segundo Arguello-García *et al.* (2004), a MLC é o parâmetro mais seguro para avaliar a susceptibilidade e a resistência e é também o mais conveniente para comparar diferentes tipos de ensaios de sensibilidade, sendo a IC₅₀ o parâmetro mais adequado para caracterizar a variação na susceptibilidade dos parasitas às drogas.

Referências Bibliográficas

Abboud, P., V. Lemée, G. Gargala, P. Brasseur, J. J. Ballet, F. Borsa-Lebas, F. Caron & L. Favenec. 2001. Sucessful treatment of Metronidazol- and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.

Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.

Adam, R. D., T. E. Nash & T. E. Wellems. 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **16**:4555-67.

Ament, M. E. & C. E. Rubin. 1972. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. *Gastroenterology.* **62**:216-226.

Ament, M. E., H. D. Ochs & S. D. Davis. 1976. Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes: a study of 39 patients. *Medicine.* **52**:227-247.

Andrews, B. J., D. Panitescu, G. H. Jipa, A. C. Vasile-Bugarin, R. P. Vasiliu & J. R. Ronnevig. 1995. Chemotherapy for Giardiasis: randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin. *Am. J. trop. Med. Hyg.* **52(4)**:318-321.

Anon. 2003. Nitazoxanide – a new anti-protozoal agent. *Med. Lett. Drugs Ther.* **45**:29-31.

Arguello-García, R., M. Cruz-Soto, L. Romero-Montoya & G. Ortega-Pierres. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC*. **54**:711-721.

Armengol, C., C. Astolfi, J. Ontiveros, D. Benitez, M. Alvarez & C. Serrano. 1997. Epidemiologia del Parasitismo intestinal infantil en el valle del Guadalquivir. *Rev. Esp. Salud Publica*. **71**:547-552.

Aronson, N. E., C. Cheney, V. Rholl, D. Burris & N. Hadro. 2001. Biliary giardiasis in a patient with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Gastroenterol*. **33**:167-170.

Basco, L. & P. Ringwald. 2000. Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches. *Sante*. **10**:47-50.

Bingham, A., E. Jarrill & E. Meyer. 1979. *Giardia* sp.: physical factores of excystation in vitro and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol*. **47**:284-291.

Boreham, P. F. L. 1994. The current status of chemotherapy for giardiasis. *In Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery Aj, eds. Giardia: from molecules to disease*. 317-326.

Boreham, P. F. L., N. C. Smith & R. W. Shepherd. 1988a. Drug resistance and the treatment of giardiasis. *In Advances in Giardia Research*. 3-7.

Boreham, P. F. L., R. E. Philips & R. W. Shepherd. 1988b. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **82**:104-106.

Borst, P. & M. Ouellette. 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:427-460.

Brasseur, P. & L. Favenec. 1995. Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. *Parasite.* **2**:422-424.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, H. N. Dodd, N. Chen & P. Upcroft. 1999. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **98**:203-214.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, M. R. Edwards & P. Upcroft. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**:155-161.

Brown, D. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. A H₂O-producing NADH oxidase from protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **28**:149-164.

Brown, H. D., A. R. Matzuk, I. R. Ilves, L. H. Peterson, S. A. Harris, L. H. Sarett, Egerton, J. J. Yakstis, W. C. Campbell & A. C. Cuckler. 1961. Antiparasitic drugs. IV 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* **83**:1764-1765.

Bui, E. T. N., P. J. Bradley & P. J. Johnson. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:9651-9656.

Bui, E. T. & P. J. Johnson. 1996. Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**:305-310.

Cedillo-Rivera, R. & O. Muñoz. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **37**:221-224.

Cerkasovová, A., J. Cerkasov & J. Kulda. 1988a. Resistance of trichomonads to metronidazole. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:485-503.

Cerkasovová, A., J. Novák, J. Cerkasov, J. Kulda & J. Tachezy. 1988b. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:505-512.

Chavez, B., R. Cedillo-Rivera & A. Martinez-Palomo. 1992. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the *in vitro* effect of Benzimidazoles. *J. Protozool.* **39**(4):510-515.

Cohen, S. A. 2005. Use of Nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: a pediatric perspective. *Current Medical Research and Opinion.* **21**:999-1004.

Crouch, A. A., W. K. Seow, L. M. Whitman & Y. H. Thong. 1990. Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:246-248.

Cruz, A., M. Cabral, M. I. Sousa & Z. Azeredo. 2002. Parasitoses intestinais. Estudo transversal em crianças de escolas do 1º ciclo da cidade do Porto. *Arg. Med.* **16**:211-218.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, E. Leite, J. C. F. Sousa & M. Cabral. 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, M. C. Silva, J. C. F. Sousa, O. Manso & M. Cabral. 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.

Davidson, R. A. 1984. Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am. J. Gastroenterol.* **79**:256-261.

Davila-Gutierrez, C. E., C. Vasquez, B. Trujillo-Hernandez & M. Huerta. 2002. Nitazoxanide compared with Quinfolam and Mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66(3)**:251-254.

Del Brutto, O. H., J. Sotelo & G. C. Roman. 1993. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. *Clin. Infect. Dis.* **17**:730-735.

Dieterich, D. T., E. A. Lew, D. P. Kotler, M. A. Poles & J. M. Orenstein. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **169(1)**:178-183.

Doumbo, O., J. F. Rossignol, E. Pichard, H. A. Traore, T. M. Dembele, M. Diakite, F. Traore & D. A. Diallo. 1997. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56(6)**:637-639.

Dunne, R. L., L. A. Dunn & P. Upcroft. 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res.* **13**:239-249.

Edlind, T. D., T. Hang & P. Chakraborty. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162**:1408-1411.

Enekwechi, L. C. & C. N. Azubike. 1994. Survey of the prevalence of intestinal parasites in children of primary school age. *West Afr. J. Med.* **13**:227-230.

Falagas, M. E. & S. L. Gorbach. 1995. Clindamycin and metronidazole. *Med. Clin. North Am.* **79**:845-67.

Farbey, M., J. Reynoldson & R. Thompson. 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int. J. Parasitol.* **25**:593-599.

Farthing, M. 1996. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25**:493-515.

Feely, D. E., J. V. Schollmeyer & S. L. Erlandsen. 1982. *Giardia* spp: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* **53**:144-154.

Fetterer, R. H. & R. S. Rew. 1984. Interaction of *Fasciola hepatica* with albendazole and its metabolites. *J. Vet. Pharm. Therap.* **7**:113-118.

Flanagan, P. A. 1992. *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **109**:1-22.

Foote, S. J. & A. f. Cowman. 1994. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop.* **56**:157-171.

Freeman, C. D., N. E. Klutman & K. C. Lamp. 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* **54**:679-409.

Galtier, P., M. Alvinerie & P. Delatour. 1986. *In vitro* sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *Am. J. Vet. Res.* **47**:447-450.

Gardner, T. B. & D. R. Hill. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.

Ghosh, S. K., A. Lohia, A. Kumar & J. Samuelson. 1996. Overexpression of Pglycoprotein gene 1 by transfected *Entamoeba histolytica* confers emetine-resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82**:257-260.

Gillin, F. D., D. S. Reiner & J. McCaffery. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:679-705.

Gillin, F. D. & L. Diamond. 1981. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by metronidazole, quinacrine, and other antimicrobial agents. *JAC.* **8**:305-316.

Gillin, F. D., S. E. Boucher, S. S. Rossi & D. S. Reiner. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **69**:164-174.

Gilman, R. H., G. S. Marquis & E. Miranda. 1988. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet* **1**:343-345.

Goldstein, F., J. J. Thornton & T. Szydlowski. 1978. Biliary tract dysfunction in giardiasis. *Am. J. Dig. Dis.* **23**:559-560.

Gordts, B., W. Hemelhof, C. Asselman & J. P. Butzler. 1985. *In vitro* susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:378-380.

Gottschall, D. W., V. J. Theodorides & R. Wang. 1990. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today.* **6**:115-124.

Hall, A. & Q. Nahar. 1993. Albendazol as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**:84-86.

Hall, M. L., N. D. Costa, R. C. Thompson, A. J. Lymbery, B. P. Meloni & R. G. Wales. 1992. Genetic variants of *Giardia duodenalis* differ in their metabolism. *Parasitol. Res.* **78**:712-714.

Harris, J. C., S. Plummer & D. Lloyd. 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **57**:614-619.

Hermans, P. E., J. A. Diaz-Buxo & J. D. Stobo. 1976. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency: clinical observations in 50 patients. *Am. J. Med.* **61**:221-237.

Hill, D. R. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**:503-525.

Hill, D. R. 1995. *Giardia lamblia*. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, N. Y. 2487-2493.

Horton, R. J. 1989. Chemotherapy of *Echinococcus* infection in man with albendazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:97-102.

Hrdy, I. & M. Muller. 1995. Primary structure and eubacterial relationship of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* **41**:388-396.

Janoff, E. N., P. D. Smith & M. J. Blaser. 1988. Acute antibody responses to *Giardia lamblia* are depressed in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **157**:798-804.

Johnson, P. J. 1993. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today*. **9**:183-186.

Jones, J. E. 1991. Giardiasis. *Primary Care* **18**:43-52.

Kappus, K. D., R. G. Jr. Lundgren & D. D. Juranek. 1994. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**:705-713.

Koch, C. J., E. M. Lord, I. M. Shapiro, R. I. Clyman & S. M. Evans. 1997. Imaging hypoxia and blood flow in normal tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **428**:585-593.

Kollaritsch, H., E. Jeschko & G. Wiedermann. 1993. Albendazole is highly effective against cutaneous larva migrans but not against *Giardia* infection: results of an open pilot trial in travellers returning from the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**:689.

Kreutner, K., V. Del Bene & M. S. Amstey. 1981. Giardiasis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **140**:895-901.

Kulda, J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* **29**:199-212.

Kulda, J. & E. Nohylová. 1995. Therapy of giardiasis. In: Kreier, J. P. (ed.), *Parasitic Protozoa*, vol. II, Academic Press, New York. 369-381.

Lemée, V., I. Zaharia, G. Nevez, M. Rabodonirina, P. Brasseur, J. J. Ballet & L. Favennec. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:819-821.

Lengerich, E. J., D. G. Addiss & D. D. Juranek. 1994. Severe giardiasis in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **18**:760-763.

Lindquist, H. D. A. 1996. Induction of albendazole resistance in *Giardia lamblia*. *Microbial Drug resistance.* **2(4)**:433-434.

Lipsitch, M. & B. R. Levin. 1997. The population dynamics of antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:363-373.

Liu, S. M., D. M. Brown, P. O'Donoghue, P. Upcroft & J. A. Upcroft. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **108**:137–140.

Majewska, A. C., W. Kasprzak, J. F. De-Jonckheere & E. Kaczmarek. 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:67-69.

Matuchansky, C., G. Touchard & M. Lemaire. 1985. Malignant lymphoma of the small bowel associated with diffuse nodular lymphoid hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **313**:166-171.

Mays, D. C., P. Ortiz-Bermudez, J. P. Lam, I. H. Tong, A. H. Fauq & J. J. Lipsky. 1998. Inhibition of recombinant human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by two intermediate metabolites of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* **55**:1099-1103.

Megraud, F. & H. P. Doermann. 1998. Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut*. **43**:S61-S65.

Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

McIntyre, P., P. Boreham, R. Phillips & R. Shepherd. 1986. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *J. Pediatr.* **108**:1005-1010.

Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

Mendelson, R. M. 1980. The treatment of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**:438-439.

Meyer, E. A. 1976. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* **39**:101-105.

Meyer, E. K. 1998. Adverse events associated with albendazole and other products used for treatment of giardiasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(1):44-46.

Mineno, T. & M. A. Avery. 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.

Misra, P. K., A. Kumar, V. Agarwal & S. C. Jagota. 1995. A comparative clinical trial of albendazole versus metronidazole in giardiasis. *Indian Pediatr.* **32**(3):291-294.

Morgan, U. M., J. A. Reynoldson & R. C. A. Thompson. 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.

Mucke, U., T. Wohlfarth, U. Fiedler, H. Baumlein, K. P. Rucknagel & S. König. 1996. Pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum*. *Eur. J. Biochem.* **237**:373-382.

Muller, M. 1992. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic proteins. *BioSystems.* **28**:33-40.

Narikawa, S. 1986. Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**:565-574.

Nash, T. E., A. O. Christopher, E. Thomas, G. Subramanian, P. Keiser & T. A. Moore. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.

Navarrete, N. & P. Torres. 1994. Prevalence of infection by intestinal helminths and protozoa in school children from a coastal locality in the province of Valdivia, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* **49**:79-80.

Olson, M., H. Ceri & D. Morck. 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitol. Today.* **16**(5):213-217.

Ortega, Y. R. & R. D. Adam. 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Inf. Dis.* **25**:545-550.

Ortiz, J. J., A. Ayoub, G. Gargala, N. L. Chegne & L. Favannec. 2001. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* **15**(9):1409.

Oxberry, M. E., J. A. Reynoldson & R. C. A. Thompson. 2000. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23**:113-120.

Pearce, D., J. Reynoldson & R. Thompson. 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.

Petri Jr, W. A. 2003. Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology.* **19**(11):523-526.

Poiares da Silva, J. M. 1992. Parasitoses intestinais. Considerações sobre 14 anos de estudo laboratorial no conelho da Lousã. *Rev. Port. Doenç. Infec.* **4**:259-264.

Pungpak, S., V. Singhasivanon, D. Bunnag, B. Radomyos, P. Nibaddhasopon & K. T. Harinasuta. 1996. Albendazole as a treatment for *Giardia* infection. *Annals Trop. Med. Parasitol.* **90**:563-565.

Rasmussen, B. A., K. Bush & F. P. Tally. 1997. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* **24(Suppl. I)**:S110-S120.

Rathod, P. K., T. McErlean & P.-C. Lee. 1997. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:9389-9393.

Reeves, R. E. 1984. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *Adv. Parasitol.* **23**:105-142.

Rendtorff, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* **59**:209-220.

Reynoldson, J. A., J. M. Behnke, M. Gracey, R. J. Horton, R. Spargo, R. M. Hopkins, C. C. Constantine, F. Gilbert, C. Stead, R. P. Hobbs & R. C. A. Thompson. 1998. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Trop.* **71**:27-44.

Reynoldson, J. A., R. C. A. Thompson & B. P. Meloni. 1991. *In vivo* efficacy of albendazole against *Giardia duodenalis* in mice. *Parasitol. Res.* **77**:325-328.

Reynoldson, J. A., R. C. A. Thompson & B. P. Meloni. 1992. The potential and possible mode of action of the benzimidazoles against *Giardia* and other protozoa. *J. Pharm. Med.* **2**:35-50.

Rodríguez-García, R., L. M. Rodriguez-Guzmán & A. H. Cruz del Castillo. 1999. Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of *Giardia lamblia* in children. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **64**:122-126.

Roe, F. J. 1977. Metronidazole: review of uses and toxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* **3(3)**:205-212.

Roger, A. J., S. G. Svard, J. Tovar, C. G. Clark, M. W. Smith, F. D. Gillin & M. L. Sogin. 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:229-234.

Romero-Cabello, R., L. R. Guerrero, M. R. M. Garcia & A. G. Cruz. 1998. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**:701-703.

Rosenthal, B., Z. Mai, D. Caplivski, S. Ghosh, H. de la Vega, T. Graf & J. Samuelson. 1997. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* **179**:3736-3745.

Rossignol, J.-F., A. Ayoub & M. S. Ayers. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* **184**:383-384.

Rousham, E. K. 1994. An increase in *Giardia intestinalis* infection among children receiving periodic antihelminthic treatment in Bangladesh. *Journal of Tropical Pediatrics.* **40**:329-333.

Samuelson, J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1533-1541.

Sanchez, L. B. 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanisms of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**:57-64.

Smith, M. W., D.-F. Feng & R. F. Doolittle. 1992. Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* **17**:489-493.

Soltys, B. J. & R. S. Gupta. 1994. Presence and cellular distribution of a 60-kDa protein related to mitochondrial HSP60 in *Giardia lamblia*. *J. Parasitol.* **80**:580-590.

Soto, J. M. & D. A. Dreiling. 1977. A case presentation of chronic cholecystitis and duodenitis. *Am. J. Gastroenterol.* **67**:265-269.

Thompson, R. C., J. A. Reynoldson & A. J. Lymbery. 1994. *Giardia*: from molecules to disease. Cambridge University Press. Cambridge.

Thompson, R. C. Andrew. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **30**:1259-1267.

Townson, S. M., G. R. Hanson, J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1994a. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **220**:439-446.

Townson, S. M., H. Laqua, P. Upcroft, P. Boreham & J. Upcroft. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.

Townson, S. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. Characterization and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**:183-193.

Townson, S. M., P. F. L. Boreham, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 1994b. Resistance to nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop.* **56**:173-194.

Tracy, J. W. & L. T. Webster. 2003. Farmacos usados na quimioterapia das helmintíases. In Gilman A. G., J. G. Hardman & L. E. Limbird. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ªed. Ed. McGraw-Hill. 841-858.

Tsuji, S., M. A. Qureshi, E. W. Hou, W. M. Fitch & S. S. L. Li. 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from xenopus, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:9392-9396.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1999. Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:447-449.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1998. My favourite cell: *Giardia*. *BioEssays.* **20**:256–263.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell, K. Benakli, P. Upcroft & P. Vanelle. 1999. Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:73-76.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell & P. Upcroft. 1996a. Quinacrine - resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology.* **112**:309-313.

Upcroft, J., R. Mitchell, N. Chen & P. Upcroft. 1996b. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin. *Microbial Drug resistance*. **2(3)**:303-308.

Upcroft, P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistance Updates*. **1**:166-168.

Upcroft, P. 1994. Multiple drug resistance in the pathogenic protozoa. *Acta Tróp.* **56**:195-212.

Van der Wouden, E., J. Thijs, J. Kusters, A. Van Zwet & J. Kleibeuker. 2001. Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* **234**:10-14.

Venkatesan, P. 1998. Albendazole. *JAC.* **41**:145-147.

Voogd, C. E. 1981. On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutat. Res.* **86(3)**:243-277.

Waldmann, T. A., M. Durm & S. Broder. 1974. Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia. *Lancet.* **2**:609-613.

Ward, H., K. N. Jalan & T. K. Maitra. 1983. Small intestinal nodular lymphoid hyperplasia in patients with giardiasis and normal serum immunoglobulins. *Gut.* **24**:120-126.

Wilson, M. E. 1998. In Public Health & Preventive Medicine, 14th Ed.; Wallace, R. B., Ed.; Appleton & Lange: Stamford, CT. 252-254.

Wolfe, M. S. 1998. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:93-100.

Wright, C. W., S. Melwani, J. D. Phillipson & D. C. Warhurst. 1992. Determination of anti-giardial activity in vitro by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Wright, J. M., L. A. Dunn, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2(6)**:529-5541.

Xiao, L., K. Saeed & R. P. Herd. 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Veterinary Parasitol.* **61**:165-170.

Yassin, M. M., M. E. Shubair, A. I. al-Hindi & S. Y. Jadallah. 1999. Prevalence of intestinal parasites among school children in Gaza City, Gaza Strip. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **29(2)**:365-373.

Yong, T. S., E. Li, D. Clark & S. L. Stanley Jr. 1996. Complementation of an *Escherichia coli adhE* mutant by the *Entamoeba histolytica* EhADH2 gene provides a method for the identification of new anti-amebic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:6464-6469.

Zaat, J. O., T. G. Mank & W. J. Assendelft. 1997. A systematic review on the treatment of giardiasis. *Trop. Med. Int. Health.* **2**:63-82.

Capítulo III

Indução de Resistência ao Metronidazol e Albendazol em *Giardia lamblia*

Indução de Resistência ao Metronidazol e Albendazol em *Giardia lamblia*

Jorge Balteiro^{1,4,5}; Rita F. Oliveira^{2,4}; Maria José Alves^{3,4}; Mário J. Pereira⁴;
Agostinho Cruz².

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-997
Coimbra, Portugal

²Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 4000-294 Porto,
Portugal

³Hospital Distrital de Chaves, Laboratório de Patologia Clínica, 5400-279 Chaves, Portugal

⁴Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁵Corresponding author: balteiro@estescoimbra.pt; Phone. + 351 239 802 430; fax. +351
239 813 395

Paper in draft form

Indução de Resistência ao Metronidazol e Albendazol em *Giardia lamblia*

Resumo:

Diferentes estudos laboratoriais com *Giardia lamblia* têm conduzido ao desenvolvimento de metodologias de indução de resistência a antiparasitários *in vitro*, de forma a complementar o diagnóstico de giardiose. A indução de resistência *in vitro* justifica-se pela dificuldade de obtenção de isolados resistentes e pela enorme importância que estes encerram para o estudo dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos parasitas. O objectivo principal deste trabalho é obter um isolado de *Giardia lamblia* resistente ao metronidazol e um isolado resistente ao albendazol utilizando duas diferentes metodologias de exposição aos fármacos em estudo, a metodologia de exposição contínua e a metodologia de exposição intermitente. Foram realizados periodicamente ensaios de sensibilidade aos antiparasitários em estudo pelo método da determinação da inibição da aderência, com a finalidade de estabelecer a concentração que inibe 50% da população (IC_{50}) e a concentração mínima letal (MLC) das diferentes linhas resistentes de *G. lamblia* ao metronidazol e ao albendazol.

O isolado utilizado foi o ACPT 98006 axenizado por Cruz *et al.* em 2003, descrito como sensível ao metronidazol e albendazol, com valores de IC_{50} de 7,49 μ M para o metronidazol e de 0,192 μ M para o albendazol. Quanto à MLC, considerada o parâmetro mais adequado para identificar resistência, os valores iniciais para o metronidazol eram de [250 μ M - 500 μ M] e para o Albendazol [0,781 μ M-1,563 μ M]. Os resultados alcançados para o metronidazol foram de 1000 μ M para a exposição intermitente, com valores da IC_{50} e da MLC de 53,03 μ M e de [3000 μ M-4000 μ M] respectivamente, e de 20 μ M para a exposição contínua, com valores de IC_{50} e de MLC de 24,71 μ M e de [1000 μ M-2000 μ M], respectivamente. Em relação ao albendazol, o processo de indução de resistência revelou-se mais difícil atingindo-se, como concentração final, 4 μ M para a exposição intermitente, com valores da IC_{50} de 0,233 μ M e da MLC de [4,688 μ M-

6,25µM], e 0,25µM para a exposição contínua, com valores da IC₅₀ de 0,358µM e da MLC de [6,25 µM-12,5µM]. Estes resultados permitem concluir que se atingiram os objectivos deste estudo com a obtenção de um isolado resistente ao metronidazol e de um isolado resistente ao albendazol. Pode-se também considerar a metodologia mais adequada para o processo de indução de resistência ao metronidazol em *G. lamblia* a metodologia de exposição intermitente cujos resultados foram claramente superiores à exposição contínua em todos os parâmetros. Contudo a metodologia de exposição contínua revelou-se a mais eficaz para induzir resistência ao albendazol em *G. lamblia*, como atestam os valores encontrados da MLC e da IC₅₀.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, resistência, metronidazol, albendazol.

Abstract:

Laboratorial studies had conducted to the development of induction of drug-resistance methodologies in *Giardia lamblia*, *in vitro*, so that giardiasis diagnosis is complemented. Difficulty in obtaining resistant isolates justifies resistance induction *in vitro*, which are important to study resistance mechanisms developed by the parasites. Obtain metronidazole-resistant and albendazole-resistant *Giardia lamblia* isolates is the main objective of this work, using two different methodologies of drug exposure: continued exposure methodology and intermittent exposure methodology. Using the inhibition of adherence method, susceptibility assays to antiparasitic drugs were performed to determine inhibition concentration IC₅₀ and Minimal Lethal Concentration (MLC) of different metronidazole and albendazole resistant strains of *Giardia lamblia*. Isolate ACPT 98006 axenized by Cruz *et al.* in 2003 was used, described as sensitive to metronidazole and albendazole, with IC₅₀ 7,49µM for metronidazole and IC₅₀ 0,192µM for albendazole. Considered the better resistance evaluation parameter, MLC initial values for metronidazole were [250µM-500µM] and [0,781µM-1,563µM] for albendazol. Metronidazole results were 1000µM for intermittent exposure, with

IC₅₀ and MLC values 53,03µM and]3000µM-4000µM], respectively, and 20µM for continued exposure, with IC₅₀ and MLC values 24,72µM and]1000µM-2000µM], respectively. Induction of albendazole-resistance process was more difficult, obtaining intermittent exposure final concentration 4µM, with IC₅₀ 0,233µM and MLC]4,688µM-2000µM], and continued exposure final concentration 0,25µM, with IC₅₀ and MLC values 0,358µM and]6,25µM-12,5µM], respectively. These results allow us to conclude objectives were achieved, obtaining a metronidazole-resistant isolate and an albendazole-resistant isolate. Intermittent exposure appears to be the most adequate methodology to induce *Giardia lamblia* metronidazole resistance, with clearly better results than continued exposure in all parameters. MLC and IC₅₀ values suggest that continued exposure methodology is more effective in the induction of albendazole resistance in *Giardia lamblia*.

Keywords: *Giardia lamblia*, resistance, metronidazole, albendazole.

1. Introdução

Giardia lamblia, também denominada por *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*, é o parasita patogénico mais frequente no intestino do homem nos países desenvolvidos (Thompson *et al.*, 1994). Embora a sua presença possa ser assintomática, infecções intensas por *G. lamblia* são responsáveis por um quadro clínico que pode englobar perturbações gastrointestinais, diarreias, má absorção, dores abdominais e por distúrbios no crescimento particularmente na criança (Adam, 1991; Cruz *et al.*, 2003b).

O tratamento corrente e recomendado para a giardiose inclui as drogas nitroheterocíclicas: metronidazol, tinidazol e furazolidona, o substituto acridina: quinacrina, e o benzimidazol: albendazol (Wright *et al.*, 2003). Destes, o metronidazol tem sido considerado como o fármaco de escolha (Upcroft & Upcroft, 2001), sendo o tratamento “standard” e o agente anti-giardiose mais utilizado em todo o mundo (Mineno & Avery, 2003). O albendazol é um tratamento

alternativo e comparável em eficácia ao metronidazol (Meloni *et al.*, 1990), em especial quando o tratamento com o metronidazol falha (Upcroft, 1998). A nitazoxanida, um novo derivado dos 5-nitrotiazolil, tem também sido descrita como eficaz no tratamento da giardiose (Rodríguez-García *et al.*, 1999).

As infecções por *Giardia lamblia* são, algumas vezes, difíceis de tratar sem uma razão aparentemente conhecida (Kulda & Nohylová, 1995; Zaat *et al.*, 1997). A resistência aos antiparasitários frequentemente utilizados é uma explicação possível (Cruz *et al.*, 2003b).

A falência do tratamento anti-giardiose tem sido atribuído à resistência aos nitroimidazóis (Lemée *et al.*, 2000; Abboud *et al.*, 2001), contudo esta tem sido relatada para todos os agentes anti-giardiose, incluindo não só o metronidazol, como a quinacrina, a furazolidona e o albendazol (Upcroft & Upcroft, 2001). Na giardiose humana, a falência da terapêutica ocorre cada vez com maior frequência devido não só à reinfecção como à resistência do parasita aos fármacos (Lemée *et al.*, 2000).

Numa terapêutica racional é assumido que o uso repetido de doses sub-terapêuticas de um fármaco, seja um 5-nitroimidazol ou um benzimidazol, pode originar populações predominantemente tolerantes aos fármacos e assim levar à falência da terapêutica pela resistência do parasita a esses fármacos. Esta possibilidade é suportada por dados clínicos e experimentais (Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da indução de resistência através de vários regimes de fármacos incluindo o aumento da concentração a níveis sub-letais ou a exposições curtas e múltiplas a níveis letais, administrados com ou sem mutagénese, têm fornecido consideráveis informações acerca da capacidade dos parasitas para fortalecer a sua resistência e protecção, bem como dos mecanismos envolvidos (Cerkasovova *et al.*, 1988a; Cerkasovova *et al.*, 1988b; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1994b; Upcroft, 1994; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b; Brown *et al.*, 1998; Upcroft, 1998; Brown *et al.*, 1999; Kulda, 1999; Upcroft *et al.*, 1999; Upcroft & Upcroft, 1999; Upcroft & Upcroft, 2001).

A resistência *in vitro* tem sido demonstrada para quatro grandes grupos de fármacos: nitroimidazóis (metronidazol), nitrofuranos (furazolidona), acridinas (quinacrina) e benzimidazóis (albendazol) (Upcroft, 1998).

Na bibliografia encontram-se muito poucos artigos sobre indução de resistência *in vitro* aos antiparasitários em *G. lamblia*.

Adoptando a terminologia de Townson *et al.* (1992), nos seus trabalhos sobre indução de resistência *in vitro* ao metronidazol e à furazolidona, podem-se classificar, de acordo com o tipo de exposição aos fármacos, as metodologias de indução de resistência utilizadas, com algumas variações, em três tipos: metodologia de exposição contínua ou constante, metodologia de exposição intermitente e metodologia com mutagenese por exposição à luz ultravioleta (UV).

Na Tabela 1 estão descritos todos os trabalhos de indução de resistência *in vitro* que utilizaram como fármacos o metronidazol e o albendazol e como metodologias de indução a metodologia contínua e/ou a metodologia intermitente.

Tabela 1 – Trabalhos de Indução de Resistência ao Metronidazol e Albendazol *in vitro* em *G. lamblia*

PRINCÍPIO ACTIVO	METODOLOGIA DE INDUÇÃO	ISOLADO	CONCENTRAÇÃO FINAL (μM)	REFERÊNCIA
Metronidazol	Contínua	BRIS/83/HEPU/106	4,96 ($\text{IC}_{50} = 6,4\mu\text{M}$) a)	Boreham <i>et al.</i> , 1988
		BAC2-M2	11,7	Townson <i>et al.</i> , 1992
		OAS1-M2		
		WB1B-M2		
		BRIS/87/HEPU/713-M2		
	Intermitente	BAC2-M1	397	
		OAS1-M1		
		WB1B-M1		
		BRIS/87/HEPU/713-M1		
Albendazol	Contínua	WB-1B	0,1	
		BRIS/89/HEPU/1065	0,2	
		BRIS/91/HEPU/1411		
		BRIS/83/HEPU/106		
		WB1B-M3		2
	Intermitente	WB, ATCC 30957	9	Lindquist, 1996

a) Valor inicial da $\text{IC}_{50} = 0,86\mu\text{M}$

O primeiro trabalho, onde se encontra descrito a indução de resistência em laboratório com *Giardia lamblia*, é da autoria de Boreham *et al.* (1988), com a

utilização de uma metodologia, que se pode designar por contínua, para induzir resistência ao metronidazol. Durante 66 semanas Boreham *et al.* cultivaram um isolado de *Giardia intestinalis* (BRIS/83/HEPU/106) em meio TYI-S-33 contendo concentrações sub-letais de metronidazol (4,96µM). No final, a sensibilidade deste isolado ao metronidazol diminuiu cerca de oito vezes.

Em 1992, Townson *et al.* induziram em laboratório resistência ao metronidazol e à furazolidona utilizando quatro isolados de *Giardia lamblia* de diferentes hospedeiros e diferentes proveniências geográficas. Para esta indução de resistência foram utilizadas três diferentes tipos de metodologias: a exposição intermitente, a exposição constante ou contínua aos fármacos e a indução de mutagénese pela exposição dos trofozoitos à luz ultravioleta (UV). Na exposição intermitente, os trofozoitos foram sujeitos aos fármacos durante 48h e posteriormente foi-lhes permitido recuperar até à próxima exposição. A concentração inicial foi o valor de ID₅₀ de cada isolado, aumentando gradualmente de forma a permitir a sobrevivência a cerca de 10-20% dos trofozoitos. Após treze semanas, o tempo de exposição foi reduzido para 24h durante mais dezassete semanas. A concentração final da exposição intermitente para o metronidazol foi de 397µM em todos os isolados, enquanto para a furazolidona a concentração final foi de 40µM para dois isolados (OAS1-F1 e WB1B-F1), de 45µM para um isolado (BAC2-F1) e de 38µM para outro (BRIS/87/HEPU/713-F1). Na exposição constante ou contínua, as oito linhas de trofozoitos de *Giardia* resistentes, que resultaram da exposição intermitente, foram submetidas a uma concentração contínua dos fármacos durante trinta semanas. A concentração inicial para cada isolado foi de cinco vezes o valor de ID₅₀, sendo ao fim de treze semanas aumentada para 11,7µM no metronidazol e para 8µM na furazolidona.

Em 1996 foram publicados dois artigos de Upcroft *et al.* sobre indução de resistência *in vitro* em *Giardia lamblia*. Em ambos, a exposição contínua foi a metodologia utilizada para induzir resistência.

Um destes artigos aborda a indução de resistência ao albendazol em cinco isolados de *Giardia lamblia*, tendo um deles (WB1B-M3) sido previamente exposto e resistido a elevadas concentrações de metronidazol através dos trabalhos de Townson *et al.* (1992), referidos anteriormente. Os trofozoitos foram sujeitos

inicialmente a uma exposição contínua de albendazol a 0,1µM, que não era letal para exposições curtas aos isolados utilizados. Os trofozoitos que cresceram acima de 0,2µM foram considerados resistentes ao albendazol. Dos cinco isolados utilizados em dois (WB-1B e BRIS/89/HEPU/1065) não foi possível induzir a resistência ao albendazol, por impossibilidade de estabilização das culturas. Outros dois isolados (BRIS/91/HEPU/1411 e BRIS/83/HEPU/106) conseguiram suportar a exposição contínua de albendazol a 0,2µM durante cerca de 245 dias, sendo posteriormente sujeitos a concentrações superiores até 0,8µM para um isolado e 0,7µM para outro durante algum tempo, embora não indefinidamente.

Segundo Upcroft *et al.* (1996b), o isolado resistente ao metronidazol (WB1B-M3) adaptou-se mais rapidamente à exposição contínua de albendazol e sobreviveu a um nível bastante mais elevado que os outros isolados, cerca de 2µM durante vários meses, perfazendo no total três anos de indução de resistência.

Esta resistência cruzada foi confirmada e reforçada pela exposição do isolado resistente durante 48h ao parbendazol, que se mostrou mais efectivo *in vitro* ao fármaco (10µM) que os trofozoitos sensíveis (0,75µM).

Segundo Upcroft *et al.* (1996b), estes resultados contribuíram para aumentar as preocupações acerca da insuficiência do arsenal terapêutico dos fármacos anti-protozoários.

Em 1996 Lindquist conseguiu induzir resistência ao albendazol utilizando, segundo ele, uma metodologia semelhante à descrita nos trabalhos de Townson *et al.* (1992), que se poderá classificar como de exposição intermitente.

Assim, cultivou um isolado de *Giardia lamblia* (WB, ATCC 30957) em meio Keister BI-S-33 modificado e sujeitou-o ao albendazol semanalmente. A exposição inicial foi a IC₉₅ (0,23µM) durante 24h, permitindo depois o seu crescimento até atingir a monocamada, seguindo-se uma nova exposição à IC₅₀ (0,12µM). Depois disto foram utilizadas, de forma empírica, altas concentrações de albendazol que se mantinham sempre que as culturas eram viáveis. A concentração final foi de 9µM. A estabilidade da resistência foi testada pelo cultivo das culturas resistentes sem adição de fármaco durante pelo menos uma

semana. Estas culturas foram depois expostas ao albendazol e monitorizadas. A exposição a longo prazo foi também avaliada pela incubação das culturas resistentes a 4,2µM de albendazol e observadas a cada 24h, tendo-se verificado, em termos de duração, uma limitação desta resistência visto que as culturas resistentes apenas resistiram a exposições de duração inferior a 96h.

Lindquist constatou também que a resistência era transitória, começando a perder-se após o crescimento das culturas sem exposição ao albendazol, contudo esta podia ser rapidamente recuperada.

Segundo Lindquist, que usou as culturas resistentes e as culturas controlo para testar a capacidade dos trofozoitos enquistarem *in vitro* utilizando o método de Gillin *et al.* (1989), o enquistamento espontâneo dos trofozoitos resistentes pode ser devido ao facto de estes conservarem, de reterem na memória e de transmitirem a resistência.

São objectivos deste estudo: obter *in vitro*, pela primeira vez em Portugal, um isolado resistente ao metronidazol e um isolado resistente ao albendazol a partir de trofozoítos previamente isolados e axenizados por Cruz *et al.* (2003); obter uma colecção de trofozoítos em diferentes estadios do processo de indução de resistência; estabelecer uma metodologia padrão, que seja eficaz, simples e rápida de executar, para a indução *in vitro* de resistência aos antiparasitários em *Giardia lamblia*.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes e Matérias-primas

Os reagentes e matérias-primas de carácter geral utilizadas foram os que a seguir se discriminam pelas marcas comerciais respectivas.

Sigma: anfotericina B (A 2942), bílis bovina (B 8381), L-cisteína.HCL (C 7880), citrato férrico amoniacal (F 5879), dimetilsulfóxido – DMSO (D 2650), gentamicina (G 1397), kanamicina (K 0254), mistura de antimicrobianos (A 5955), solução balanceada de sais de Hanks (H 8264), tampão fosfato salino (P 4417).

Difco: casitone (0259-17-9), extracto de levedura (0127-17-9).

Merck: cloreto de sódio (1.06404), glicose (1.08342), hidróxido de sódio (1.06498), dihidrogenofosfato de potássio (1.04873), hidrolisado pancreático de caseína (1.02239).

J. M. Vaz Pereira: formol 35-37%.

Biochrom: soro bovino (S9115).

Riedel-de-Haen: ácido ascórbico (33034), hidrogenofosfato de potássio (04248).

Panreac: extracto de levedura (403687).

2.1.2. Antiparasitários

Foram utilizados o metronidazol (M 1547) e o albendazol (A 4673) da SIGMA.

Soluções concentradas foram preparadas em água destilada para o metronidazol e em DMSO no caso do albendazol. A concentração final de DMSO nos tubos dos ensaios foi sempre inferior a 0,5%.

2.1.3. Isolado

Foi utilizado o isolado de *Giardia lamblia* ACPT 98006, axenizado por Cruz *et al.* (2003), descrito como sensível ao metronidazol e albendazol.

Os trofozoítos de *G. lamblia* foram cultivados rotineiramente a 37°C em meio de cultura TYI-S-33 modificado (Keister, 1983) (Anexo I).

2.1.4. Equipamento

Sistema de ultrafiltração Nalgene modelo DS0320.

Microscópio Nikon modelo Eclipse E600, com óptica de contraste interferencial de fase (DIC).

Microscópio invertido Nikon modelo Eclipse TC300, com óptica de contraste Hoffman.

2.2. Métodos

2.2.1. Metodologias de Indução de Resistência

A metodologia adoptada no presente estudo baseou-se nos trabalhos de indução de resistência em *G. lamblia* de Townson *et al.* (1992). Assim, induziu-se *in vitro* a resistência expondo trofozoítos de *G. lamblia* ao metronidazol e ao albendazol recorrendo a duas diferentes metodologias: metodologia de exposição intermitente e metodologia de exposição contínua.

2.2.1.1. Metodologia de Exposição Intermitente

Nesta metodologia de indução de resistência, os trofozoítos de *G. lamblia* foram sujeitos durante 24h, uma vez por semana, a elevadas concentrações, consideradas sub-letais, de metronidazol e de albendazol, permitindo depois a sua recuperação, em meio sem fármaco, até à próxima exposição. As concentrações aumentavam, de forma empírica, por períodos nunca inferiores a duas semanas.

2.2.1.2. Metodologia de Exposição Contínua

Nesta metodologia de indução de resistência, os trofozoítos de *G. lamblia* foram cultivados diariamente em meio de cultura contendo concentrações sub-letais dos fármacos. As concentrações foram aumentadas, de forma empírica, sempre que se verificava a plena estabilização das culturas ao princípio activo, com o crescimento dos trofozoítos até próximo da monocamada.

2.2.2. Criopreservação de Trofozoítos e Reconstituição de Culturas

Com a finalidade de preservar os isolados resistentes obtidos em ambas as metodologias e nos dois fármacos, foram periodicamente congelados os trofozoítos de *G. lamblia* (Anexo II) segundo a metodologia de Hautus *et al.* (1988).

Para reconstituir as amostras, a descongelação foi realizada rapidamente em banho de água a 37°C, seguido de centrifugação a 600g/10minutos e ressuspensão dos trofozoítos em meio TYI-S-33 modificado. Repetiu-se o processo de centrifugação e ressuspensão, após o que se incubaram a 37°C.

2.2.3. Ensaios de Sensibilidade de Trofozoítos de *G. lamblia* aos Antiparasitários por Determinação da Inibição da Aderência

Foram realizados periodicamente ensaios, sempre com duas réplicas, de sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* aos antiparasitários em estudo pelo método da determinação da inibição da aderência de Meloni *et al.* (1990), com a finalidade de estabelecer a concentração inibitória para 50% da população (IC₅₀) e a concentração mínima letal (MLC) das diferentes linhas resistentes de *G. lamblia* ao metronidazol e ao albendazol.

Nove mililitros de meio de cultura modificado foram inoculados com cerca de 5×10^5 trofozoítos nos vários tubos de cultura. Diluições apropriadas dos antiparasitários foram adicionadas de modo a obter séries de concentrações desejadas para o metronidazol ($0,5$ a $6 \times 10^3 \mu\text{M}$) e albendazol (48×10^{-3} a $25 \mu\text{M}$), completando-se depois o volume de 10ml com meio de cultura. Após incubação a 37°C/24h foi determinado o número de trofozoítos aderentes à parede dos tubos, por campo visual, com ampliação de 200x em microscópio invertido. A inibição da aderência foi determinada por comparação com os valores do controle de cada ensaio.

A MLC foi determinada segundo o método de Upcroft *et al.* (1999) adaptado, pela verificação da sobrevivência e crescimento dos trofozoítos em meio sem fármacos cinco dias após os ensaios.

2.2.4. Tratamento estatístico

Para avaliar a resistência da *G. lamblia* ao metronidazol e albendazol nas diferentes linhas intermitentes e contínuas, foi utilizada a análise de Probit (Finney, 1977) para a determinação das respectivas concentrações inibitórias (IC₅₀).

3. Resultados

3.1. Indução de Resistência ao Metronidazol

Os resultados da indução de resistência ao metronidazol, com o isolado ACPT 98006 axenizado por Cruz *et al.* (2003), utilizando a metodologia de exposição intermitente e contínua encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Na exposição intermitente, a concentração final a que os trofozoitos de *G. lamblia* foram sujeitos foi de 1000µM, valor cem vezes superior à concentração de partida para a indução de resistência.

Ao longo do processo de indução de resistência, a susceptibilidade dos trofozoitos foi sendo avaliada através de ensaios de determinação da inibição da aderência aos tubos de cultura para verificação da IC₅₀ e da MLC. Pela análise da Tabela 2 pode observar-se que a sensibilidade final dos trofozoitos resistentes ao metronidazol diminuiu cerca de sete vírgula cinco vezes e a MLC aumentou doze vezes com a metodologia de exposição intermitente.

O valor da IC₅₀ para a concentração final de exposição por esta metodologia ao metronidazol aumentou cerca de sete vezes, quando comparado

com o valor inicial do isolado em estudo; é também, cerca de duas vezes, superior ao valor final da IC₅₀ da exposição contínua para este fármaco.

Tabela 2: Resultados da Exposição ao Metronidazol pela Metodologia Intermitente

Concentração Metronidazol (μM)	IC₅₀ (μM)	MLC (μM)
0	7,49 a)]250 – 500] b)
200	7,52]500 – 1000]
300	15,75]1000 – 2000]
400	38,38]1000 – 2000]
500	44, 62]2000 – 3000]
1000	53,03]3000 – 4000]

a) Cruz *et al.*, 2003.

b) Valor obtido e não publicado por Cruz *et al.*, 2003

Os resultados da exposição contínua do isolado ACPT 98006 de *G. lamblia* ao metronidazol encontram-se descritos na tabela 3. A concentração inicial de indução foi o correspondente ao IC₅₀, 7,5 μ M, sendo a concentração final de 20 μ M, cerca de dois vírgula sete vezes superior ao valor da concentração inicial.

Tabela 3: Resultados da Exposição ao Metronidazol pela Metodologia Contínua

Concentração Metronidazol (μM)	IC₅₀ (μM)	MLC (μM)
0	7,49 a)]250 – 500] b)
7,5	9,57]500 – 1000]
12,5	16,36]1000 – 2000]
20,0	24,71]1000 – 2000]

a) Cruz *et al.*, 2003.

b) Valor obtido e não publicado por Cruz *et al.*, 2003

Nesta metodologia de indução de resistência, á semelhança da anterior, foi efectuado uma avaliação ao longo do estudo da sensibilidade dos trofozoitos em relação a este fármaco. Assim, a sensibilidade final dos trofozoítos resistentes diminuiu cerca de três vírgula três vezes e a MLC aumentou quatro vezes em relação á situação inicial do isolado em estudo.

3.2. Indução de Resistência ao Albendazol

Os resultados alcançados para o albendazol, em ambas as metodologias, comparativamente ao metronidazol, foram extremamente difíceis de obter devido ao efeito devastador do albendazol sobre as culturas *in vitro* de *G. lamblia*.

Os resultados da exposição intermitente e contínua, do isolado ACPT 98006 de *G. lamblia*, ao albendazol encontram-se descritos na Tabela 4 e 5, respectivamente.

A concentração inicial de indução foi para a metodologia contínua de 0,05µM, valor cerca de quatro vezes mais pequeno que a IC₅₀ do isolado em estudo, e de 0,2µM para a metodologia intermitente, correspondente, mais ou menos, ao valor da IC₅₀. Os valores finais da concentração de exposição foram de 0,25µM para o método contínuo, cinco vezes superior à concentração inicial, e de 4µM para o método intermitente, vinte vezes superior à concentração inicial.

Importa também salientar, que todas as tentativas para estabilizar as culturas da exposição contínua a valores superiores aos acima referidos se revelaram infrutíferas.

Tal como para o metronidazol, a susceptibilidade dos trofozoitos foi sendo avaliada, ao longo de todo o processo de indução de resistência, através de ensaios de determinação da inibição da aderência aos tubos de cultura para verificação da IC₅₀ e da MLC.

Pela análise da Tabela 4 pode observar-se que a sensibilidade final dos trofozoitos resistentes ao albendazol diminuiu apenas cerca de um vírgula vinte vezes e a MLC aumentou cerca de seis vezes com a metodologia de exposição intermitente.

Tabela 4: Resultados da Exposição ao Albendazol pela Metodologia Intermitente

Concentração Albendazol (μM)	IC₅₀ (μM)	MLC (μM)
0	0,192 a)]0,781 – 1,563] b)
4	0,233]4,688 – 6,25]

a) Cruz *et al.*, 2003.

b) Valor obtido e não publicado por Cruz *et al.*, 2003

Os resultados da exposição contínua ao albendazol foram superiores aos resultados da exposição intermitente em ambos os parâmetros, como demonstra a Tabela 5.

A sensibilidade final dos trofozoitos resistentes diminuiu quase duas vezes quando comparada com a sensibilidade inicial, e o valor da MLC final aumentou mais de oito vezes com esta metodologia.

Tabela 5: Resultados da Exposição ao Albendazol pela Metodologia Contínua

Concentração Albendazol (μM)	IC₅₀ (μM)	MLC (μM)
0	0,192 a)]0,781 – 1,563] b)
0,25	0,358]6,25 – 12,5]

a) Cruz *et al.*, 2003.

b) Valor obtido e não publicado por Cruz *et al.*, 2003

4. Discussão

São poucos os estudos publicados sobre indução de resistência a antiparasitários em *Giardia lamblia*, contudo alguns conseguiram demonstrar que

esta pode ser induzida em laboratório: Boreham *et al.* (1988); Townson *et al.* (1992); Upcroft *et al.* (1996a); Upcroft *et al.* (1996b); Lindquist, *et al.* (1996).

A resistência induzida neste estudo ao albendazol e ao metronidazol num isolado de *G. lamblia* utilizando duas metodologias distintas, poderá revelar-se de uma enorme importância para futuras investigações nesta área, nomeadamente sobre os mecanismos desenvolvidos pelo parasita que lhe permitiram resistir a longas exposições e a elevadas concentrações de ambos os fármacos.

No metronidazol, os resultados da metodologia de exposição intermitente foram claramente superiores aos resultados da exposição contínua em todos os parâmetros. Os valores da concentração final da exposição intermitente foram cinquenta vezes superiores aos da metodologia contínua. Quando comparamos a MLC em ambas as metodologias de indução de resistência, verificamos que a intermitente foi cerca de três vezes superior à contínua. Os resultados da IC₅₀ no metronidazol revelaram valores na metodologia intermitente cerca de duas vezes superiores aos verificados na metodologia contínua.

No que diz respeito ao albendazol a situação é inversa. Apesar da metodologia intermitente permitir uma concentração final de exposição dezasseis vezes superior à exposição contínua, os valores da IC₅₀ e da MLC são mais elevados nesta última exposição. Quando comparamos a IC₅₀ obtida nas duas metodologias de exposição, verificamos que o seu valor é cerca de um vírgula cinquenta e quatro mais elevado na exposição contínua. Nesta metodologia de exposição, os valores da MLC são também cerca de duas vezes superiores aos atingidos na metodologia intermitente.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a exposição intermitente é a metodologia de indução de resistência mais eficaz para se obter trofozoitos de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol, e que a exposição contínua é a metodologia que revelou ser mais capaz de produzir trofozoitos resistentes ao albendazol.

A comparação dos resultados do presente estudo com outros estudos congêneres é dificultada pela inexistência, nestes últimos, de informação acerca da IC₅₀ e a MLC, dois parâmetros considerados por muitos autores como essenciais para determinar o grau de resistência e de perda de sensibilidade final

obtida pelos isolados, no processo de indução *in vitro* de resistência em *G. lamblia*. A exceção são os trabalhos de Boreham *et al.* (1988) que mencionam os valores de ID₅₀ para o metronidazol ao longo do processo de indução de resistência utilizando uma metodologia de exposição contínua. Neste estudo, o valor final da IC₅₀ é cerca de sete vírgula quarenta e quatro vezes superior ao valor inicial. Estes valores de perda de sensibilidade alcançados são muito idênticos aos obtidos no presente estudo com a metodologia de exposição intermitente para o metronidazol.

Segundo Arguello-García *et al.* (2004), a MLC é o parâmetro mais seguro para avaliar a susceptibilidade/resistência e é também o mais conveniente para comparar diferentes tipos de ensaios de sensibilidade, sendo a IC₅₀ o parâmetro mais adequado para caracterizar a variação na susceptibilidade dos parasitas aos fármacos.

Apesar disto, é possível comparar os resultados obtidos no presente trabalho com outros estudos tendo em conta as concentrações finais de exposição alcançadas.

Assim, os resultados obtidos para a indução de resistência ao metronidazol, em ambas as metodologias, ultrapassam claramente os valores descritos por Townson *et al.* (1992) para a concentração final de exposição, que foram de 397µM para a exposição intermitente e de 11,7µM para a exposição contínua.

Na indução de resistência ao albendazol, os resultados alcançados pela exposição contínua superam os valores da concentração final de exposição obtidos por Upcroft *et al.* (1996b) para dois isolados, conforme se pode verificar na Tabela 1.

A indução de resistência *in vitro* ao metronidazol revelou ser um processo mais fácil de obter do que com o albendazol. Embora inicialmente tenha sido necessário alguma contenção no aumento das concentrações de exposição ao metronidazol, em ambas as metodologias, a partir dos 400µM, para a exposição intermitente, as células revelaram estar mais adaptadas às condições adversas do meio provocadas pelas altas concentrações de metronidazol. Exemplo disto, é o intervalo de valores da MLC para a exposição a 1000µM, que se situou entre os

3000 e os 4000 μ M revelando ser possível, por uma questão temporal tal não foi realizado, continuar o processo de indução até concentrações bastante mais elevadas. Aliás, a indução de resistência para o metronidazol, no que concerne à metodologia de exposição intermitente, revelou-se passível de seguimento para concentrações mais elevadas de exposição.

O processo de indução de resistência ao albendazol, fármaco que é *in vitro*, comparativamente ao metronidazol, cerca de 50 vezes mais efectivo (Meloni *et al.*, 1990; Cruz *et al.*, 2003), confirmou as dificuldades sentidas por Chavez *et al.* (1992), quando tentou sem sucesso cultivar trofozoítos de *G. lamblia* devido às grosseiras modificações que este fármaco provocava na morfologia das células do parasita, bem como à fragmentação que produzia no disco adesivo com dispersão dos microtúbulos e dos microribossomas no citoplasma.

A resistência ao albendazol foi extremamente difícil de alcançar, pela maior necessidade de tempo para as células se adaptarem à exposição a este fármaco, dado serem extremamente sensíveis ao aumento da concentração deste princípio activo. Assim, o aumento da concentração de exposição teve de ser muito lento e gradual, nomeadamente para a metodologia contínua onde os aumentos não podiam ser superiores a 0,05 μ M, sob pena de se perderem as culturas.

Todas as tentativas de estabilizar as culturas a concentrações superiores a 0,25 μ M de Albendazol com a metodologia de exposição contínua revelaram-se infrutíferas. Ao contrário, a exposição intermitente ao albendazol mostrou-se passível de prosseguir para valores mais elevados, se tal fosse o nosso propósito, como atesta o valor da MLC obtido por esta metodologia.

Os resultados obtidos para o Albendazol vêm reforçar a ideia de que a concentração final de exposição não é por si só factor suficiente para avaliar o grau de resistência desenvolvido pelos trofozoítos. À concentração final de exposição importa pois associar os valores da IC₅₀ e da MLC, como se comprova pelos resultados obtidos pela exposição contínua onde os trofozoítos revelaram valores de IC₅₀ e MLC superiores à exposição intermitente apesar de terem suportado concentrações de exposição final inferiores.

Os resultados da exposição ao albendazol sugerem também, na nossa opinião, a possibilidade de no futuro se utilizar uma metodologia de indução de

resistência em *Giardia lamblia* que cruze a exposição contínua com a exposição intermitente. Não tendo sido possível sujeitar os trofozoitos resistentes ao albendazol pela exposição contínua a concentrações superiores a 0,25µM e tendo-se revelado a metodologia mais adequada para produzir resistência, como comprova, em especial, os valores da MLC que se situaram entre os 6,25µM e os 12,5µM, bastante acima da concentração final da exposição intermitente que se situou nos 4µM, seria, quanto a nós, interessante sujeitar gradualmente estes trofozoitos resistentes, resultantes da exposição contínua, a altas concentrações do fármaco pela metodologia de exposição intermitente, com o objectivo de se obter um isolado porventura ainda mais resistente ao albendazol.

Apesar da estabilização das culturas com albendazol ser dificultada pela grande agressividade e pelo efeito devastador deste antiparasitário para com as células de *G. lamblia*, os resultados obtidos, no que diz respeito à concentração final de exposição, encontram-se ligeiramente acima dos descritos por Upcroft *et al.* (1996), que foram de 0,2µM, utilizando a metodologia de exposição contínua, uma vez que a concentração de 2µM foi obtida para um isolado previamente resistente ao metronidazol através dos trabalhos de Townson *et al.* (1992), conforme se pode verificar pela análise da Tabela 1.

Um facto relevante observado na exposição intermitente, a partir de concentrações superiores a 400µM para o metronidazol e superiores a 4µM para o albendazol, foi a formação de quistos. Provavelmente, este enquistamento poderá ser explicado como um mecanismo de resposta celular face às condições adversas do meio pela presença de concentrações elevadas dos fármacos.

A formação de quistos encontra-se descrita, embora de forma pouco explícita, nos trabalhos de indução de resistência em *G. lamblia* com o albendazol desenvolvidos por Lindquist (1996).

Para a metronidazol não temos conhecimento de qualquer referência anterior a este enquistamento em trabalhos de indução de resistência em *Giardia lamblia*. A razão para tal talvez seja o facto de nunca se terem atingido valores de exposição superiores a 400µM.

Referências Bibliográficas

Abboud, P., V. Lemée, G. Gargala, P. Brasseur, J. J. Ballet, F. Borsa-Lebas, F. Caron & L. Favenec. 2001. Sucessful treatment of Metronidazol- and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.

Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.

Arguello-García, R., M. Cruz-Soto, L. Romero-Montoya & G. Ortega-Pierres. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.

Boreham, P. F. L., R. E. Philips & R. W. Shepherd. 1988b. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**:104-106.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, H. N. Dodd, N. Chen & P. Upcroft. 1999. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **98**:203-214.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, M. R. Edwards & P. Upcroft. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**:155-161.

Brown, D. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. A H₂O-producing NADH oxidase from protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **28**:149-164.

Cerkasovová, A., J. Cerkasov & J. Kulda. 1988a. Resistance of trichomonads to metronidazole. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:485-503.

Cerkasovová, A., J. Novák, J. Cerkasov, J. Kulda & J. Tachezy. 1988b. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:505-512.

Chavez, B., R. Cedillo-Rivera & A. Martinez-Palomo. 1992. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the *in vitro* effect of Benzimidazoles. *J. Protozool.* **39**(4):510-515.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, E. Leite, J. C. F. Sousa & M. Cabral. 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, M. C. Silva, J. C. F. Sousa, O. Manso & M. Cabral. 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.

Finney, D. 1977. *Probit analysis*. New York, Cambridge. University Press.

Gillin, F. D., S. E. Boucher, S. S. Rossi & D. S. Reiner. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **69**:164-174.

Hautus, M., L. Kortbeek, J. Vetter & J. Laarman. 1988. *In vitro* excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**:858-861.

Keister, D. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**:487-488.

Kulda, J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* **29**:199-212.

Kulda, J. & E. Nohylová. 1995. Therapy of giardiasis. In: Kreier, J. P. (ed.), *Parasitic Protozoa*, vol. II, Academic Press, New York, pp. 369-381.

Lemée, V., I. Zaharia, G. Nevez, M. Rabodonirina, P. Brasseur, J. J. Ballet & L. Favennec. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *JAC.* **46**:819-821.

Lindquist, H. D. A. 1996. Induction of albendazole resistance in *Giardia lamblia*. *Microbial Drug resistance.* **2**(4):433-434.

Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

Mineno, T. & M. A. Avery. 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.

Rodríguez-García, R., L. M. Rodríguez-Guzmán & A. H. Cruz del Castillo. 1999. Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of *Giardia lamblia* in children. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **64**:122-126.

Thompson, R. C., J. A. Reynoldson & A. J. Lymbery. 1994. *Giardia*: from molecules to disease. Cambridge University Press. Cambridge.

Townson, S. M., G. R. Hanson, J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1994a. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **220**:439-446.

Townson, S. M., H. Laqua, P. Upcroft, P. Boreham & J. Upcroft. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.

Townson, S. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. Characterization and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**:183-193.

Townson, S. M., P. F. L. Boreham, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 1994b. Resistance to nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop.* **56**:173-194.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1999. Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:447-449.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell, K. Benakli, P. Upcroft & P. Vanelle. 1999. Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:73-76.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell & P. Upcroft. 1996a. Quinacrine - resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology.* **112**:309-313.

Upcroft, J., R. Mitchell, N. Chen & P. Upcroft. 1996b. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin. *Microbial Drug resistance.* **2(3)**:303-308.

Upcroft, P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistance Updates*. **1**:166-168.

Upcroft, P. 1994. Multiple drug resistance in the pathogenic protozoa. *Acta Tróp.* **56**:195-212.

Wright, J. M., L. A. Dunn, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2(6)**:529-5541.

Zaat, J. O., T. G. Mank & W. J. Assendelft. 1997. A systematic review on the treatment of giardiasis. *Trop. Med. Int. Health*. **2**:63-82.

Capítulo IV

Discussão Geral

Discussão Geral

Embora em número reduzido, existem alguns estudos publicados sobre indução de resistência *in vitro* a antiparasitários em *Giardia lamblia*: Boreham *et al.* (1988); Townson *et al.* (1992); Upcroft *et al.* (1996a); Upcroft *et al.* (1996b); Lindquist, *et al.* (1996).

A resistência *in vitro* tem sido demonstrada para quatro grandes grupos de fármacos: nitroimidazóis (metronidazol), nitrofuranos (furazolidona), acridinas (quinacrina) e benzimidazóis (albendazol) (Upcroft, 1998).

O desenvolvimento da indução de resistência *in vitro* através do aumento da concentração de exposição a níveis sub-letais ou a exposições curtas e múltiplas a níveis letais dos fármacos, administrados com ou sem indução de mutagênese, têm fornecido consideráveis informações acerca da capacidade dos parasitas para fortalecer a sua resistência, bem como dos mecanismos envolvidos (Cerkasovova *et al.*, 1988a; Cerkasovova *et al.*, 1988b; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993; Townson *et al.*, 1994a; Townson *et al.*, 1994b; Upcroft, 1994; Brown *et al.*, 1996; Townson *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1996a; Upcroft *et al.*, 1996b; Brown *et al.*, 1998; Upcroft, 1998; Brown *et al.*, 1999; Kulda, 1999; Upcroft *et al.*, 1999; Upcroft & Upcroft, 1999; Upcroft & Upcroft, 2001).

Contudo, a reduzida informação encontrada em alguns artigos sobre a metodologia usada para a indução de resistência e sobre os resultados obtidos, e a diversidade de metodologias utilizadas bem como as diferenças significativas entre estas, dificultam sobremaneira a compreensão e o estabelecimento de normativas para a indução de resistência *in vitro* e a comparação efectiva dos resultados obtidos e das metodologias utilizadas.

Por outro lado, sendo a MLC considerada por Arguello-García *et al.* (2004) o parâmetro mais seguro para avaliar a susceptibilidade/resistência, e a IC₅₀ o parâmetro mais adequado para caracterizar a variação na susceptibilidade dos parasitas às drogas, a ausência de qualquer informação acerca da variação dos valores destes dois parâmetros ao longo do processo de indução de resistência *in*

vitro, em todos os trabalhos publicados até à presente data, também não permitem aquilatar a verdadeira dimensão e o grau efectivo de resistência desenvolvido pelos trofozoitos de *Giardia lamblia* expostos aos fármacos.

Este estudo permitiu obter, pela primeira vez em Portugal, isolados de *Giardia lamblia* resistentes ao albendazol e isolados resistentes ao metronidazol, dois dos fármacos mais utilizados no combate à giardiose, e com mecanismos de actuação e locais alvo bastante distintos, o metronidazol interacciona com o ADN e o albendazol interage com as tubulinas e/ou giardinas do citoesqueleto. Isto indicia que os mecanismos de resistência obtidos pelo parasita também poderão ser diferentes para os dois fármacos. Para o albendazol pensa-se que o citoesqueleto estará implicado na resistência, com o aumento dos corpúsculos medianos. Relativamente à resistência ao metronidazol, haverá uma diminuição da sua activação pela diminuição da PFOR estando também cogitado o envolvimento de outros mecanismos de resistência como sejam a diminuição da ferredoxina, a expressão em excesso da BOR e o desenvolvimento de um possível mecanismo de efluxo activo.

Estudos anteriores indicam que o tratamento da giardiose falha devido, em parte, à existência de resistências aos fármacos (Townson *et al.*, 1992; Lemée *et al.*, 2000).

Os isolados resistentes obtidos poderão possibilitar o estudo dos mecanismos que estão na origem desta resistência contribuindo para a compreensão desta problemática e para um uso mais racional destes fármacos, bem como para a definição de diferentes estratégias terapêuticas e para o desenvolvimento de novas moléculas com actividade terapêutica.

Embora a constatação de resistências, quer ao metronidazol quer ao albendazol, já observadas noutros países (Farbey *et al.*, 1995; Lemée *et al.*, 2000), ainda não se encontre descrita para Portugal, a compreensão dos mecanismos de resistência aos fármacos em *Giardia lamblia* poderá ser uma excelente contribuição para evitar a sua ocorrência.

A metodologia de indução de resistência em *G. lamblia* adoptada no presente estudo baseou-se nos trabalhos de Townson *et al.* (1992). Assim, induziu-se *in vitro* a resistência expondo trofozoítos de *G. lamblia* ao metronidazol

e ao albendazol recorrendo a duas diferentes metodologias: metodologia de exposição intermitente e metodologia de exposição contínua.

Com a finalidade de estabelecer a IC₅₀ e a MLC das diferentes linhas resistentes de *G. lamblia* ao metronidazol e ao albendazol foram realizados, ao longo do processo de indução de resistência, ensaios de sensibilidade dos trofozoítos aos antiparasitários em estudo, pelo método da determinação da inibição da aderência de Meloni *et al.* (1990).

Para o metronidazol, a metodologia de exposição intermitente para a indução de resistência em *Giardia lamblia* foi a que se revelou mais eficaz e mais fácil de concretizar *in vitro*, como atestam os valores dos três parâmetros em estudo: IC₅₀, MLC e concentração final de exposição. Foi, sem sombra de dúvida, a metodologia onde as células foram capazes de suportar as mais altas concentrações do princípio activo, talvez devido ao facto da exposição ser de apenas 24 horas e das células disporem de seis dias de recuperação até à exposição seguinte. A corroborar este facto estiveram também os valores da MLC e da IC₅₀ atingidos pelos trofozoítos nesta metodologia, que foram claramente superiores à metodologia contínua.

Com o albendazol verificou-se o inverso, pois foi a exposição contínua a metodologia que obteve os valores de IC₅₀ e de MLC mais altos, parâmetros considerados os mais adequados para avaliar o grau de resistência desenvolvido.

Embora a metodologia intermitente tenha permitido alcançar uma concentração de exposição dezasseis vezes superior à metodologia contínua esta última provou, pelos restantes parâmetros em estudo, ser mais eficaz quanto ao desenvolvimento de resistência *in vitro* da *Giardia lamblia* ao albendazol.

A relativa “facilidade” para se obter isolados resistentes ao metronidazol em contraste com a extrema dificuldade sentida para o albendazol é algo que não sendo novo, vem reforçar a ideia do albendazol ser uma alternativa válida ao metronidazol para o tratamento da giardiose.

Este trabalho permitiu também alcançar, pela primeira vez em Portugal, uma colecção de isolados de *Giardia lamblia* em diferentes estadios de resistência. Esta colecção foi obtida com sucessivas criopreservações dos trofozoítos de *G. lamblia* das várias linhas de indução de resistência ao longo de todo o processo.

Estamos crentes que esta vasta colecção encerrará, em si mesmo, um enorme manancial de informações, nomeadamente acerca do desenvolvimento progressivo de eventuais mecanismos fisiológicos de adaptação/resistência no parasita que lhe permite suportar os sucessivos aumentos da concentração dos fármacos em estudo.

A detecção de possíveis novos mecanismos de resistência do parasita aos fármacos poderá trazer um acréscimo considerável de informação e de novos conhecimentos que se deverão confrontar com os mecanismos actualmente conhecidos.

Foi já sugerido que o metronidazol apesar de ser um princípio activo eficaz e económico corre o risco de se tornar obsoleto (Farbey *et al.*, 1995) face a novos agentes quimioterápicos que têm surgido e que se apresentam praticamente desprovidos de efeitos secundários. Em face disto e do aparecimento de resistências, Sangster *et al.* (2002) recomendaram seis medidas que consideraram fundamentais para salvaguardar o metronidazol, enquanto tal for possível. As medidas, apesar de polémicas, passavam pela compreensão dos mecanismos de resistência, pelo desenvolvimento de testes de resistência, por não tratar a giardiose na ausência de sintomas, por identificar o agente causal antes do tratamento, por não utilizar o metronidazol profilacticamente e, por último, por utilizar regimes de tratamento adequados.

Deste modo, pensamos que a obtenção desta colecção de isolados resistentes, enquanto ferramenta de trabalho fundamental para o futuro, possibilitará estudos que facultarão informações que permitam ultrapassar as resistências observadas ao metronidazol, para que este se mantenha como o tratamento *standard* na giardiose.

Por ultimo, e como perspectivas para o futuro, pensamos que este trabalho poderá ser referencial para os trabalhos nesta área, em virtude da metodologia de exposição intermitente ao metronidazol, adoptada no presente estudo, se ter revelado uma metodologia relativamente fácil de implantar, rápida, eficaz e com excelentes resultados alcançados como comprovam a concentração final de exposição, a MLC e a IC₅₀. No que concerne ao albendazol, a metodologia mais eficaz e que obteve melhores resultados para a indução de resistência foi a

exposição contínua, sendo por isso, a metodologia de eleição para induzir resistência ao albendazol em *Giardia lamblia*.

A metodologia de exposição intermitente, em ambos os fármacos, deixou em aberto a possibilidade de continuidade do processo de indução de resistência *in vitro* para concentrações de exposição superiores às alcançadas por este trabalho, como atesta, em especial, os valores atingidos para a MLC.

Os resultados da exposição ao albendazol sugerem, na nossa opinião, a possibilidade de se utilizar uma metodologia de indução de resistência em *Giardia lamblia* que cruze a exposição contínua com a exposição intermitente tendo como objectivo principal a obtenção de um isolado porventura ainda mais resistente ao albendazol.

A colecção de trofozoitos com graduações e níveis de resistência desiguais será essencial para, em futuros trabalhos, se analisar a evolução dos eventuais mecanismos de resistência desenvolvidos por este parasita que lhe permite, de forma gradual, adaptar-se às condições adversas proporcionadas pelas altas concentrações dos fármacos. A avaliação sequencial desta adaptação poderá servir para aferir se esta é resultante de uma diferenciação genética ou de uma adaptação morfofuncional ou somática dos trofozoitos resistentes.

Poderá também ser interessante clarificar o desenvolvimento de quistos observado neste estudo na metodologia intermitente de indução de resistência, para ambos os fármacos em estudo. Para o metronidazol é a primeira vez que tal é relatado, talvez por nunca se terem atingido valores de concentração de exposição acima dos 400µM.

Referências Bibliográficas

Abboud, P., V. Lemée, G. Gargala, P. Brasseur, J. J. Ballet, F. Borsa-Lebas, F. Caron & L. Favenec. 2001. Sucessful treatment of Metronidazol- and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.

- Adam, R. D.** 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.
- Adam, R. D.** 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.
- Adam, R. D., T. E. Nash & T. E. Wellems.** 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **16**:4555-67.
- Ament, M. E. & C. E. Rubin.** 1972. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. *Gastroenterology.* **62**:216-226.
- Ament, M. E., H. D. Ochs & S. D. Davis.** 1976. Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes: a study of 39 patients. *Medicine.* **52**:227-247.
- Andrews, B. J., D. Panitescu, G. H. Jipa, A. C. Vasile-Bugarin, R. P. Vasiliu & J. R. Ronnevig.** 1995. Chemotherapy for Giardiasis: randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin. *Am. J. trop. Med. Hyg.* **52(4)**:318-321.
- Anon.** 2003. Nitazoxanide – a new anti-protozoal agent. *Med. Lett. Drugs Ther.* **45**:29-31.
- Arguello-García, R., M. Cruz-Soto, L. Romero-Montoya & G. Ortega-Pierres.** 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.
- Armengol, C., C. Astolfi, J. Ontiveros, D. Benitez, M. Alvarez & C. Serrano.** 1997. Epidemiologia del Parasitismo intestinal infantil en el valle del Guadalquivir. *Rev. Esp. Salud Publica.* **71**:547-552.

Aronson, N. E., C. Cheney, V. Rhol, D. Burris & N. Hadro. 2001. Biliary giardiasis in a patient with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Gastroenterol.* **33**:167-170.

Basco, L. & P. Ringwald. 2000. Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches. *Sante.* **10**:47-50.

Bingham, A., E. Jarrill & E. Meyer. 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47**:284-291.

Boreham, P. F. L. 1994. The current status of chemotherapy for giardiasis. In Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ, eds. *Giardia: from molecules to disease.* 317-326.

Boreham, P. F. L., N. C. Smith & R. W. Shepherd. 1988a. Drug resistance and the treatment of giardiasis. In *Advances in Giardia Research.* 3-7.

Boreham, P. F. L., R. E. Philips & R. W. Shepherd. 1988b. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**:104-106.

Borst, P. & M. Ouellette. 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:427-460.

Brasseur, P. & L. Favenec. 1995. Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. *Parasite.* **2**:422-424.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, H. N. Dodd, N. Chen & P. Upcroft. 1999. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **98**:203-214.

Brown, D. M., J. A. Upcroft, M. R. Edwards & P. Upcroft. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**:155-161.

Brown, D. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. A H₂O-producing NADH oxidase from protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **28**:149-164.

Brown, H. D., A. R. Matzuk, I. R. Ilves, L. H. Peterson, S. A. Harris, L. H. Sarett, Egerton, J. J. Yakstis, W. C. Campbell & A. C. Cuckler. 1961. Antiparasitic drugs. IV 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* **83**:1764-1765.

Bui, E. T. N., P. J. Bradley & P. J. Johnson. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:9651-9656.

Bui, E. T. & P. J. Johnson. 1996. Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**:305-310.

Cedillo-Rivera, R. & O. Muñoz. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **37**:221-224.

Cerkasovová, A., J. Cerkasov & J. Kulda. 1988a. Resistance of trichomonads to metronidazole. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:485-503.

Cerkasovová, A., J. Novák, J. Cerkasov, J. Kulda & J. Tachezy. 1988b. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ. Carol. Biol.* **30**:505-512.

Chavez, B., R. Cedillo-Rivera & A. Martinez-Palomo. 1992. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the *in vitro* effect of Benzimidazoles. *J. Protozool.* **39(4)**:510-515.

Cohen, S. A. 2005. Use of Nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: a pediatric perspective. *Current Medical Research and Opinion.* **21**:999-1004.

Crouch, A. A., W. K. Seow, L. M. Whitman & Y. H. Thong. 1990. Sensitivity in vitro of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:246-248.

Cruz, A., M. Cabral, M. I. Sousa & Z. Azeredo. 2002. Parasitoses intestinais. Estudo transversal em crianças de escolas do 1º ciclo da cidade do Porto. *Arq. Med.* **16**:211-218.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, E. Leite, J. C. F. Sousa & M. Cabral. 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.

Cruz, A., M. I. Sousa, Z. Azeredo, M. C. Silva, J. C. F. Sousa, O. Manso & M. Cabral. 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs in vitro. *Acta Tróp.* **88**:131-135.

Davidson, R. A. 1984. Issues in clinical parasitology: the treatment of giardiasis. *Am. J. Gastroenterol.* **79**:256-261.

Davila-Gutierrez, C. E., C. Vasquez, B. Trujillo-Hernandez & M. Huerta. 2002. Nitazoxanide compared with Quinfamide and Mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66(3)**:251-254.

Del Brutto, O. H., J. Sotelo & G. C. Roman. 1993. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. *Clin. Infect. Dis.* **17**:730-735.

Dieterich, D. T., E. A. Lew, D. P. Kotler, M. A. Poles & J. M. Orenstein. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **169**(1):178-183.

Doumbo, O., J. F. Rossignol, E. Pichard, H. A. Traore, T. M. Dembele, M. Diakite, F. Traore & D. A. Diallo. 1997. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**(6):637-639.

Dunne, R. L., L. A. Dunn & P. Upcroft. 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res.* **13**:239-249.

Edlind, T. D., T. Hang & P. Chakraborty. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162**:1408-1411.

Enekwechi, L. C. & C. N. Azubike. 1994. Survey of the prevalence of intestinal parasites in children of primary school age. *West Afr. J. Med.* **13**:227-230.

Falagas, M. E. & S. L. Gorbach. 1995. Clindamycin and metronidazole. *Med. Clin. North Am.* **79**:845-67.

Farbey, M., J. Reynoldson & R. Thompson. 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int. J. Parasitol.* **25**:593-599.

Farthing, M. 1996. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25**:493-515.

Feely, D. E., J. V. Schollmeyer & S. L. Erlandsen. 1982. *Giardia* spp: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* **53**:144-154.

Fetterer, R. H. & R. S. Rew. 1984. Interaction of *Fasciola hepatica* with albendazole and its metabolites. *J. Vet. Pharm. Therap.* **7**:113-118.

Finney, D. 1977. *Probit analysis*. New York, Cambridge. University Press.

Flanagan, P. A. 1992. *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **109**:1-22.

Foote, S. J. & A. f. Cowman. 1994. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop.* **56**:157-171.

Freeman, C. D., N. E. Klutman & K. C. Lamp. 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* **54**:679-409.

Galtier, P., M. Alvinerie & P. Delatour. 1986. *In vitro* sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *Am. J. Vet. Res.* **47**:447-450.

Gardner, T. B. & D. R. Hill. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.

Ghosh, S. K., A. Lohia, A. Kumar & J. Samuelson. 1996. Overexpression of Pglycoprotein gene 1 by transfected *Entamoeba histolytica* confers emetine-resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82**:257-260.

Gillin, F. D., D. S. Reiner & J. McCaffery. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:679-705.

Gillin, F. D. & L. Diamond. 1981. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by metronidazole, quinacrine, and other antimicrobial agents. *JAC.* **8**:305-316.

Gillin, F. D., S. E. Boucher, S. S. Rossi & D. S. Reiner. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **69**:164-174.

Gilman, R. H., G. S. Marquis & E. Miranda. 1988. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet* **1**:343-345.

Goldstein, F., J. J. Thornton & T. Szydlowski. 1978. Biliary tract dysfunction in giardiasis. *Am. J. Dig. Dis.* **23**:559-560.

Gordts, B., W. Hemelhof, C. Asselman & J. P. Butzler. 1985. *In vitro* susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:378-380.

Gottschall, D. W., V. J. Theodorides & R. Wang. 1990. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today.* **6**:115-124.

Hall, A. & Q. Nahar. 1993. Albendazol as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**:84-86.

Hall, M. L., N. D. Costa, R. C. Thompson, A. J. Lymbery, B. P. Meloni & R. G. Wales. 1992. Genetic variants of *Giardia duodenalis* differ in their metabolism. *Parasitol. Res.* **78**:712-714.

Harris, J. C., S. Plummer & D. Lloyd. 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.

Hautus, M., L. Kortbeek, J. Vetter & J. Laarman. 1988. *In vitro* excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**:858-861.

Hermans, P. E., J. A. Diaz-Buxo & J. D. Stobo. 1976. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency: clinical observations in 50 patients. *Am. J. Med.* **61**:221-237.

Hill, D. R. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**:503-525.

Hill, D. R. 1995. *Giardia lamblia*. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, New York, N. Y. 2487-2493.

Horton, R. J. 1989. Chemotherapy of *Echinococcus* infection in man with albendazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:97-102.

Hrdy, I. & M. Muller. 1995. Primary structure and eubacterial relationship of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* **41**:388-396.

Janoff, E. N., P. D. Smith & M. J. Blaser. 1988. Acute antibody responses to *Giardia lamblia* are depressed in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **157**:798-804.

Johnson, P. J. 1993. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today.* **9**:183-186.

Jones, J. E. 1991. Giardiasis. *Primary Care* **18**:43-52.

Kappus, K. D., R. G. Jr. Lundgren & D. D. Juranek. 1994. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**:705-713.

Keister, D. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**:487-488.

Koch, C. J., E. M. Lord, I. M. Shapiro, R. I. Clyman & S. M. Evans. 1997. Imaging hypoxia and blood flow in normal tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **428**:585-593.

Kollaritsch, H., E. Jeschko & G. Wiedermann. 1993. Albendazole is highly effective against cutaneous larva migrans but not against *Giardia* infection: results of an open pilot trial in travellers returning from the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**:689.

Kreutner, K., V. Del Bene & M. S. Amstey. 1981. Giardiasis in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **140**:895-901.

Kulda, J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* **29**:199-212.

Kulda, J. & E. Nohylová. 1995. Therapy of giardiasis. In: Kreier, J. P. (ed.), *Parasitic Protozoa*, vol. II, Academic Press, New York. 369-381.

Lemée, V., I. Zaharia, G. Nevez, M. Rabodonirina, P. Brasseur, J. J. Ballet & L. Favenec. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *JAC.* **46**:819-821.

Lengerich, E. J., D. G. Addiss & D. D. Juranek. 1994. Severe giardiasis in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **18**:760-763.

Lindquist, H. D. A. 1996. Induction of albendazole resistance in *Giardia lamblia*. *Microbial Drug resistance*. **2(4)**:433-434.

Lipsitch, M. & B. R. Levin. 1997. The population dynamics of antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:363-373.

Liu, S. M., D. M. Brown, P. O'Donoghue, P. Upcroft & J. A. Upcroft. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **108**:137–140.

Majewska, A. C., W. Kasprzak, J. F. De-Jonckheere & E. Kaczmarek. 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:67-69.

Marshall, M., D. Naumovitz, C. Ortega R Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:67-85.

Matuchansky, C., G. Touchard & M. Lemaire. 1985. Malignant lymphoma of the small bowel associated with diffuse nodular lymphoid hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **313**:166-171.

Mays, D. C., P. Ortiz-Bermudez, J. P. Lam, I. H. Tong, A. H. Fauq & J. J. Lipsky. 1998. Inhibition of recombinant human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by two intermediate metabolites of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* **55**:1099-1103.

McIntyre, P., P. Boreham, R. Phillips & R. Shepherd. 1986. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *J. Pediatr.* **108**:1005-1010.

Megraud, F. & H. P. Doermann. 1998. Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut*. **43**:S61-S65.

Meloni, B., R. Thompson, J. Reynoldson & P. Seville. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

Mendelson, R. M. 1980. The treatment of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**:438-439.

Meyer, E. A. 1976. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* **39**:101-105.

Meyer, E. K. 1998. Adverse events associated with albendazole and other products used for treatment of giardiasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213**(1):44-46.

Mineno, T. & M. A. Avery. 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.

Misra, P. K., A. Kumar, V. Agarwal & S. C. Jagota. 1995. A comparative clinical trial of albendazole versus metronidazole in giardiasis. *Indian Pediatr.* **32**(3):291-294.

Morgan, U. M., J. A. Reynoldson & R. C. A. Thompson. 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.

Mucke, U., T. Wohlfarth, U. Fiedler, H. Baumlein, K. P. Rucknagel & S. König. 1996. Pyruvate decarboxylase from *Pisum sativum*. *Eur. J. Biochem.* **237**:373-382.

Muller, M. 1992. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic proteins. *BioSystems.* **28**:33-40.

Narikawa, S. 1986. Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *JAC*. **18**:565-574.

Nash, T. E., A. O. Christopher, E. Thomas, G. Subramanian, P. Keiser & T. A. Moore. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.

Navarrete, N. & P. Torres. 1994. Prevalence of infection by intestinal helminths and protozoa in school children from a coastal locality in the province of Valdivia, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* **49**:79-80.

Olson, M., H. Ceri & D. Morck. 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitol. Today*. **16**(5):213-217.

Ortega, Y. R. & R. D. Adam. 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.

Ortiz, J. J., A. Ayoub, G. Gargala, N. L. Chegne & L. Favannec. 2001. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **15**(9):1409.

Oxberry, M. E., J. A. Reynoldson & R. C. A. Thompson. 2000. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23**:113-120.

Pearce, D., J. Reynoldson & R. Thompson. 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.

Petri Jr, W. A. 2003. Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology*. **19**(11):523-526.

Poiares da Silva, J. M. 1992. Parasitoses intestinais. Considerações sobre 14 anos de estudo laboratorial no concelho da Lousã. *Rev. Port. Doenç. Infec.* **4**:259-264.

Pungpak, S., V. Singhasivanon, D. Bunnag, B. Radomyos, P. Nibaddhasopon & K. T. Harinasuta. 1996. Albendazole as a treatment for *Giardia* infection. *Annals Trop. Med. Parasitol.* **90**:563-565.

Rasmussen, B. A., K. Bush & F. P. Tally. 1997. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* **24(Suppl. I)**:S110-S120.

Rathod, P. K., T. McErlean & P.-C. Lee. 1997. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:9389-9393.

Reeves, R. E. 1984. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *Adv. Parasitol.* **23**:105-142.

Rendtorff, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* **59**:209-220.

Reynoldson, J. A., J. M. Behnke, M. Gracey, R. J. Horton, R. Spargo, R. M. Hopkins, C. C. Constantine, F. Gilbert, C. Stead, R. P. Hobbs & R. C. A. Thompson. 1998. Efficacy of albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia. *Acta Trop.* **71**:27-44.

Reynoldson, J. A., R. C. A. Thompson & B. P. Meloni. 1991. *In vivo* efficacy of albendazole against *Giardia duodenalis* in mice. *Parasitol. Res.* **77**:325-328.

Reynoldson, J. A., R. C. A. Thompson & B. P. Meloni. 1992. The potential and possible mode of action of the benzimidazoles against *Giardia* and other protozoa. *J. Pharm. Med.* **2**:35-50.

Rodríguez-García, R., L. M. Rodriguez-Guzmán & A. H. Cruz del Castillo. 1999. Effectiveness and safety of mebendazole compared to nitazoxanide in the treatment of *Giardia lamblia* in children. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **64**:122-126.

Roe, F. J. 1977. Metronidazole: review of uses and toxicity. *JAC.* **3(3)**:205-212.

Roger, A. J., S. G. Svard, J. Tovar, C. G. Clark, M. W. Smith, F. D. Gillin & M. L. Sogin. 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:229-234.

Romero-Cabello, R., L. R. Guerrero, M. R. M. Garcia & A. G. Cruz. 1998. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**:701-703.

Rosenthal, B., Z. Mai, D. Caplivski, S. Ghosh, H. de la Vega, T. Graf & J. Samuelson. 1997. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* **179**:3736-3745.

Rossignol, J.-F., A. Ayoub & M. S. Ayers. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* **184**:383-384.

Rousham, E. K. 1994. An increase in *Giardia intestinalis* infection among children receiving periodic antihelminthic treatment in Bangladesh. *Journal of Tropical Pediatrics.* **40**:329-333.

Samuelson, J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1533-1541.

Sanchez, L. B. 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanisms of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**:57-64.

Sangster, N., P. Batterham, H. D. Chapman, M. Duraisingh, L. Le Jambre, M. Shirley, J. Upcroft & P. Upcroft. 2002. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int. J. Parasitol.* **32**:637–653.

Smith, M. W., D.-F. Feng & R. F. Doolittle. 1992. Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* **17**:489-493.

Soltys, B. J. & R. S. Gupta. 1994. Presence and cellular distribution of a 60-kDa protein related to mitochondrial HSP60 in *Giardia lamblia*. *J. Parasitol.* **80**:580-590.

Soto, J. M. & D. A. Dreiling. 1977. A case presentation of chronic cholecystitis and duodenitis. *Am. J. Gastroenterol.* **67**:265-269.

Thompson, R. C., J. A. Reynoldson & A. J. Lymbery. 1994. *Giardia*: from molecules to disease. Cambridge University Press. Cambridge.

Thompson, R. C. Andrew. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **30**:1259-1267.

Townson, S. M., G. R. Hanson, J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1994a. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **220**:439-446.

Townson, S. M., H. Laqua, P. Upcroft, P. Boreham & J. Upcroft. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.

Townson, S. M., J. A. Upcroft & P. Upcroft. 1996. Characterization and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**:183-193.

Townson, S. M., P. F. L. Boreham, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 1994b. Resistance to nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop.* **56**:173-194.

Tracy, J. W. & L. T. Webster. 2003. Farmacos usados na quimioterapia das helmintíases. In Gilman A. G., J. G. Hardman & L. E. Limbird. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ªed. Ed. McGraw-Hill. 841-858.

Tsuji, S., M. A. Qureshi, E. W. Hou, W. M. Fitch & S. S. L. Li. 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from xenopus, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:9392-9396.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1999. Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:447-449.

Upcroft, J. A. & P. Upcroft. 1998. My favourite cell: *Giardia*. *BioEssays.* **20**:256–263.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell, K. Benakli, P. Upcroft & P. Vanelle. 1999. Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:73-76.

Upcroft, J. A., R. W. Campbell & P. Upcroft. 1996a. Quinacrine - resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology.* **112**:309-313.

Upcroft, J., R. Mitchell, N. Chen & P. Upcroft. 1996b. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin. *Microbial Drug resistance.* **2(3)**:303-308.

Upcroft, P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistance Updates.* **1**:166-168.

Upcroft, P. 1994. Multiple drug resistance in the pathogenic protozoa. *Acta Tróp.* **56**:195-212.

Van der Wouden, E., J. Thijs, J. Kusters, A. Van Zwet & J. Kleibeuker. 2001. Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* **234**:10-14.

Venkatesan, P. 1998. Albendazole. *JAC.* **41**:145-147.

Voogd, C. E. 1981. On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutat. Res.* **86(3)**:243-277.

Waldmann, T. A., M. Durm & S. Broder. 1974. Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinaemia. *Lancet.* **2**:609-613.

Ward, H., K. N. Jalan & T. K. Maitra. 1983. Small intestinal nodular lymphoid hyperplasia in patients with giardiasis and normal serum immunoglobulins. *Gut*. **24**:120-126.

Wilson, M. E. 1998. In Public Health & Preventive Medicine, 14th Ed.; Wallace, R. B., Ed.; Appleton & Lange: Stamford, CT. 252-254.

Wolfe, M. S. 1998. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:93-100.

Wright, C. W., S. Melwani, J. D. Phillipson & D. C. Warhurst. 1992. Determination of anti-giardial activity in vitro by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Wright, J. M., L. A. Dunn, P. Upcroft & J. A. Upcroft. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2(6)**:529-5541.

Xiao, L., K. Saeed & R. P. Herd. 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Veterinary Parasitol.* **61**:165-170.

Yassin, M. M., M. E. Shubair, A. I. al-Hindi & S. Y. Jadallah. 1999. Prevalence of intestinal parasites among school children in Gaza City, Gaza Strip. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **29(2)**:365-373.

Yong, T. S., E. Li, D. Clark & S. L. Stanley Jr. 1996. Complementation of an *Escherichia coli adhE* mutant by the *Entamoeba histolytica* EhADH2 gene provides a method for the identification of new anti-amebic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:6464-6469.

Zaat, J. O., T. G. Mank & W. J. Assendelft. 1997. A systematic review on the treatment of giardiasis. *Trop. Med. Int. Health.* **2**:63-82.

Anexos

Anexo I

Meio de cultura TYI-S-33 modificado (Keister, 1983)

<i>Composição:</i>	<i>g/l</i>
Hidrolisado pancreático de caseína	20,0
Extracto de levedura	10,0
Glicose	10,0
Bilis bovina	0,6
Cloreto de sódio	2,0
L-cisteína, cloreto monohidratado	2,0
Ácido ascórbico	0,2
Hidrogenofosfato de potássio	1,0
Dihidrogenofosfato de potássio	0,6
Citrato férrico amoniacal	0,0228

Foram dissolvidos em água destilada os diversos componentes de modo a perfazer um volume final de 900ml, de seguida foram adicionados 100ml de soro bovino inactivado, a 56°C/20min. em banho-de-água. O pH foi acertado para 7,0-7,2 com hidróxido de sódio 1M. Em ambiente asséptico foram adicionados os agentes antimicrobianos de modo a conseguirem-se as concentrações desejadas para cultivo (gentamicina 0,05mg/ml, penicilina G 100unidades/ml, estreptomicina 0,1mg/ml e anfotericina B 0,25µg/ml).

Procedeu-se à ultrafiltração com membrana filtrante de 0,45µm em sistema Nalgene modelo DS0320 e conservou-se o meio a 4°C.

Anexo II

Criopreservação de trofozoítos

Com a finalidade de preservar os isolados resistentes obtidos nas duas metodologias e em ambos os fármacos, foram periodicamente congelados os trofozoítos de *G. lamblia* segundo a metodologia de Hautus *et al.* (1988).

Os tubos de cultura com trofozoítos num período tardio da fase exponencial de crescimento, foram agitados e rejeitado o sobrenadante. Após serem de novo cheios com meio de cultura, foram mergulhados num banho de gelo durante aproximadamente 15 minutos e agitados, periodicamente, afim de que todos os trofozoítos desaderissem das paredes do tubo. Após centrifugação, a 600g/10min./4°C, foi ajustada a concentração das células a, aproximadamente, 2×10^6 /ml com meio de cultura TYI-S-33 modificado e adicionado de DMSO, até concentração final entre 5 e 10%. Procedeu-se depois à distribuição em fracções de 1ml em criotubos (Nunk) e congelação a -80°C, num contentor (Nalgene) com álcool isopropílico.

Para reconstituir as amostras, a descongelação foi realizada rapidamente em banho de água a 37°C, seguido de centrifugação a 600g/10minutos e ressuspensão dos trofozoítos em meio TYI-S-33 modificado. Repetiu-se o processo de centrifugação e ressuspensão, após o que se incubaram a 37°C.